

Deutsches Herzzentrum Berlin
Stiftung des Bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

Isolierung und Kryokonservierung von vaskulären Zellen aus
menschlichen Nabelschnurgefäßen für das
Tissue Engineering von kardiovaskulären Geweben
(Herzklappen)

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Liv Krämer
Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Ennker
2. Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Roland Hetzer
3. Prof. Dr. med. Theodor Fischlein

Datum der Promotion: 15. April 2005

1. Einleitung	3
1.1 Allgemeine Einleitung	3
1.2 Tissue Engineering (TE)	6
Allgemeiner Teil	6
Zellquelle	10
1.3 Fragestellung	11
2. Material und Methoden	14
2.1 Zellkultur	14
Zellgewinnung	14
Gewinnung von Endothelzellen	15
Gewinnen von Myofibroblasten	16
2.2 Kryokonservierung	17
Kryokonservierung der Zellkultur	17
Kryokonservierung der gesamten Nabelschnur	17
2.3 Auftauprozess	17
Auftauen der Zellkulturen	17
Auftauen der Nabelschnüre	18
2.4 Methoden der Zellidentifikation	18
Identifikation mittels Zellmorphologie	18
Identifikation mittels Immunfluoreszenz	18
Wachstumsverhalten der Zellkulturen	19
2.5 Herstellung der Polymerkonstrukte	20
Gerüstmaterial	20
Klappenherstellung	21
Zellbesiedlung	24
Versuchsaufbau	25

2.6 Evaluation der Konstrukte	27
Histologie	27
Elektronenmikroskopie	28
Quantifizierung des Kollagen-Gehaltes	29
Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von kryokonservierten Zellen und dem besiedelten Herzklappenkonstrukten	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Zellkultur	31
Zellgewinnung	31
Morphologie der gewonnen Zellen	31
Identifikation mittels indirekter Immunfluoreszenz	34
Wachstumsverhalten der Zellkulturen	38
3.2 Herstellung der Polymerkonstrukte	41
Gerüstmaterial	41
Klappenherstellung	42
Klappenbesiedlung	43
Bioreaktor und dynamische Zellkonditionierung	44
3.3 Evaluierung der Konstrukte	45
Histologie und Immunhistochemie	45
Elektronenmikroskopie	49
Untersuchungen auf Kollagen-Gehalt	50
Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von kryokonservierten Zellen und dem besiedelten Herzklappenkonstrukten	51
4. Diskussion	53
5. Zusammenfassung	62
Literaturverzeichnis	63

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den häufigsten Ursachen für die Morbidität und Mortalität in unserer Gesellschaft.^{1 2}

Einen großen Anteil stellen neben Erkrankungen der Herzkranzgefäße und des Herzmuskels die Veränderungen der Herzklappen dar.³ Die Therapie der Wahl besteht heutzutage im operativen Ersatz dieser erkrankten oder abnormen Herzklappen, durch mechanische, biologische Prothesen oder durch sogenannte Homografts.

Im Jahre 1952 wurde die erste erfolgreiche Herzklappenimplantation zuerst in die Aorta descendens durch Hufnagel et al.⁴ und 1960/62 durch Harken⁵ und Starr⁶ in Aorten- und Mitralposition durchgeführt. In den darauf folgenden Jahrzehnten erfolgte eine stetige Verbesserung der Klappenprothesen im Hinblick auf ihre Haltbarkeit und Funktionalität.⁷

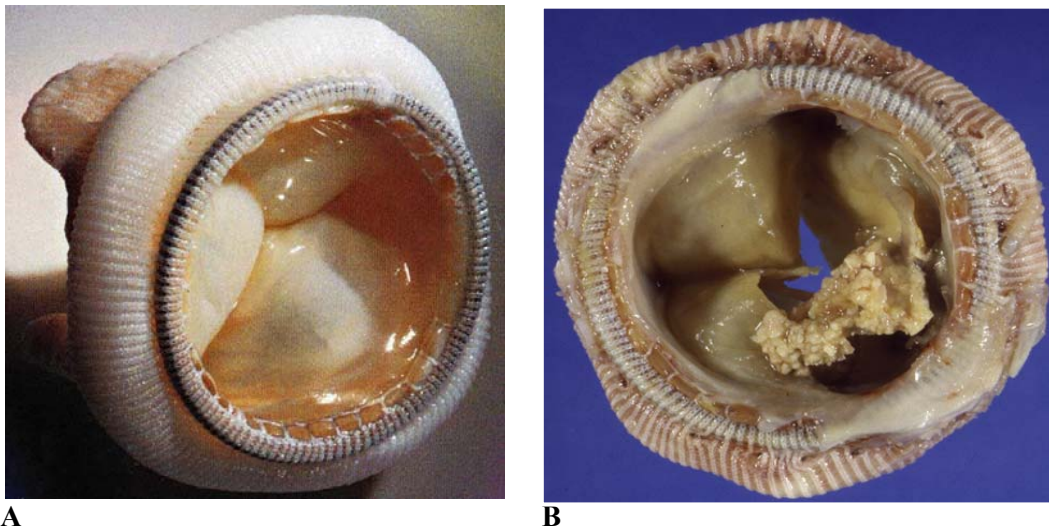
Die mechanischen Klappenprothesen (Abb.1) zeichnen sich durch ihre gute Hämodynamik und insbesondere durch ihre lange Haltbarkeit aus.⁸ Nach Implantation entsteht jedoch das Problem der Thrombogenität und der daraus lebenslang notwendigen Antikoagulation des Patienten. Daraus ergibt sich ein erhöhtes Risiko in bezug auf eine verstärkte Blutungsneigung und den damit verbundenen Problemen.⁹ Ein weiterer limitierender Faktor eines mechanischen Klappenersatzes ist die infektiöse Endokarditis und dem damit verbundenen Klappenversagen.^{10 11}



Abb.1:
Beispiel für eine mechanische Klappe (St. Jude Medical)

Neben den mechanischen werden auch biologische Prothesen zum Klappenersatz verwendet. Diese Klappen werden aus tierischem (Xenograft) oder aus menschlichem Gewebe hergestellt (Homograft).¹²

Xenografts (Abb.2) bestehen typischerweise aus schweineaortalem Gewebe oder aus Rinderperikard.¹³ Sie sind häufig zusätzlich chemisch mit Gluteraldehyd behandelt, um ihre Haltbarkeit zu erhöhen. Ein wesentlicher Vorteil dieser Klappen besteht in dem Verzicht auf einer lebenslangen Antikoagulation, da Bioprothesen ein geringeres thrombogenes Potential besitzen. Ein wichtiger Nachteil ist ihre geringe durchschnittliche Haltbarkeit von 10-15 Jahren.¹⁴



A

B

Abb.2

A. Abbildung einer biologischen Herzklappe

B. Klappe mit degenerativen Klappensegeln

Kryokonservierte Homografts oder funktionsfähige Klappen z.B. Spenderherzen, die nicht für die Transplantation verwendet werden, finden ebenfalls Anwendung als Klappenersatz. Wie bei den Xenografts ist auch bei den Homografts keine Antikoagulation notwendig.¹⁵

Ein wichtiger Nachteil dieser Art des Klappenersatzes besteht in ihrer begrenzten Verfügbarkeit.¹⁶ Einige Studien berichten über das Versagen von Homograftklappen bei Kindern,¹⁷ und Yankah et al. beschreibt immunologische Reaktionen bei diesen Verfahren.¹⁸

All den verwendeten Herzklappenprothesen oder Homografts ist gemeinsam, dass sie aus fremden, nicht autologem Gewebe bestehen und somit auch kein Wachstums- bzw. Regenerationspotential aufweisen.¹⁹ Eine besondere Gruppe stellen pädiatrische Patienten dar. Sie haben ihr Größenwachstum noch nicht abgeschlossen und benötigen deshalb häufig Korrekturoperationen, um die Größe der Klappen ihrem Wachstum anpassen zu können.²⁰ So existiert bis zum jetzigen Zeitpunkt keine ideale Herzklappenprothese, die nicht antikoaguliert, resistent gegenüber Infektionen ist, sich in das umgebende Gewebe gut integriert, mitwächst und letztendlich eine gute hämodynamische Funktion hat.²¹

1.2 Tissue Engineering (TE)

Allgemeiner Teil

Ein möglicher Ansatz zur Überwindung der genannten Limitationen in der Behandlung von Gefäß- und Herzklappenerkrankungen stellt das Tissue Engineering von kardiovaskulärem Gewebe dar.

Das Prinzip des Tissue Engineerings besteht darin, aus körpereigenen Zellen einen funktionalen und vitalen Gewebe- und Organersatz herzustellen, um erkrankte oder zerstörte Organe und Gewebe zu ersetzen.²²

Dabei werden Zellen, in unserem Modell vom Patienten selbst (autolog) isoliert, kultiviert, auf ein resorbierbares Gerüst besiedelt und in-vitro zu einem funktionellen Zell-Gerüst-Konstrukt konditioniert.

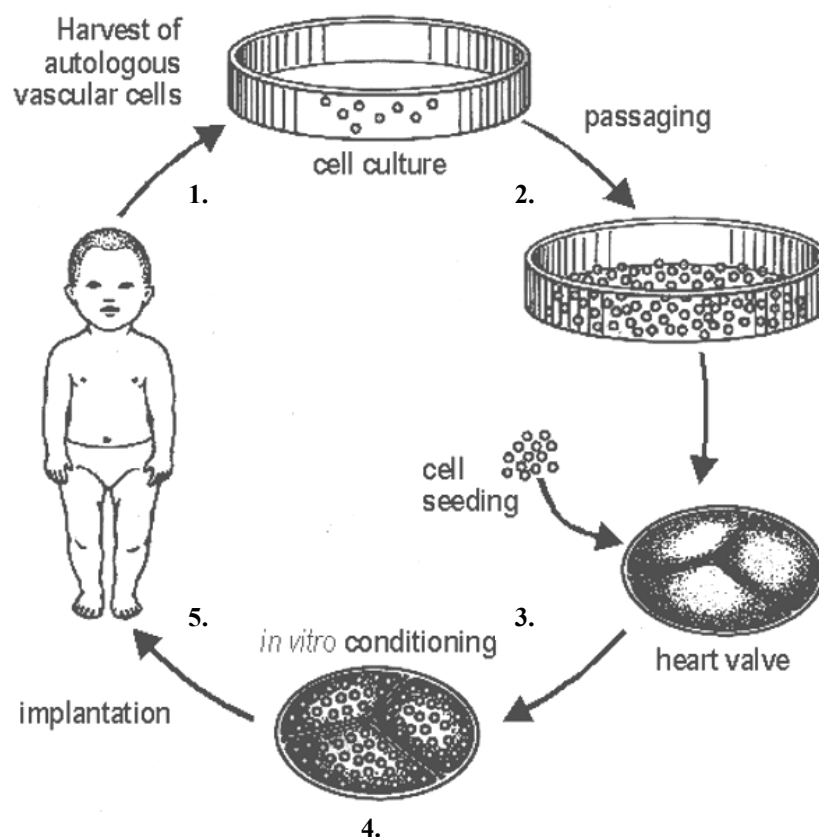


Abb.3

Das Prinzip des Tissue Engineerings:

1. Isolierung der autologen Zellen
2. Kultivierung
3. Besiedlung auf ein geeignetes Polymer
4. Konditionierung und evtl.
5. Reimplantation

Aktuell beschäftigen sich weltweit mehrere Forschungsgruppen mit diesem Konzept. Ihre Arbeiten unterscheiden sich in der Wahl der Gerüstmaterialien und der Zellquellen.²³

Das funktionale und physiologische Design und die Auswahl des geeigneten Polymergerüsts als Stützgerüst für die Zellen spielen eine entscheidende Rolle für die Entwicklung von „tissue engineerter“ Konstrukten wie z.B. der Herzklappe.

Bei der Verwendung von dezellularisierter, xenogener Matrix,²⁴ welche mit Spenderzellen besiedelt wird, besteht einerseits der Vorteil, dass man ein nahezu perfektes Klappendesign übernimmt und mit guten hämodynamischen Bedingungen rechnen kann. Andererseits scheint es, als ob die aufgebrauchten vaskulären Zellen nicht in das Innere der Matrix hineinwachsen können. Erste vielversprechende Ergebnisse werden von Bader et al.²⁵ sowie Steinhoff et al.²⁶ demonstriert. Das diese Matrix im unbesiedelten Zustand nicht unproblematisch ist, hat die Arbeit von Simon et al. gezeigt. Hier wurden unbesiedelte, dezellularisierte, xenogene Herzklappengerüste mit fatalen Folgen implantiert.²⁷ Diese Versuche zeigen die Wichtigkeit der Zellbesiedlung und der in-vitro Konditionierung vor der eigentlichen Implantation, um eine genügende Gewebeentwicklung schon vorab zu erreichen.

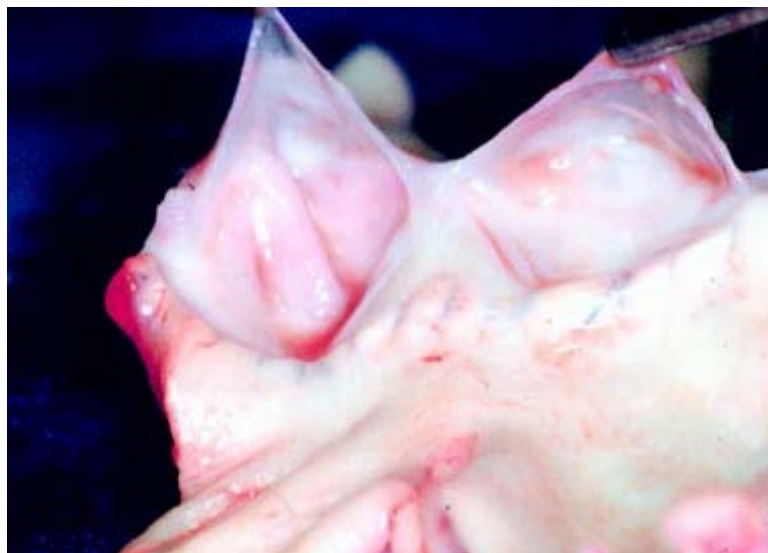


Abb.4

(Steinhoff et al.)

Besiedelte dezellularisierte xenogene Herzklappe 12 Wochen nach Implantation

Ein weiterer Ansatz stellt die Verwendung biologischer Matrix dar. Einer der möglichen Anwendungen wurde z.B. in der Arbeit von Ye et al. beschrieben. Hier wurde der Gebrauch von Fibringel für das Tissue Engineering demonstriert. Dieses Fibringel ist ein biologisch abbaubares Polymer, welches aus Blut des Patienten selbst hergestellt werden kann. Ye et al. beschrieb die Herstellung eines Zell-Fibringel-Konstruktes aus einer Suspension humaner aortaler Myofibroblasten und einer Fibrinogen-, Thrombin- und Calciumchloridlösung, welche dann polymerisiert wurde.²⁸ Schließlich wurde daraus eine dreisegelige Herzklappe hergestellt.²⁹

Bei einer weiteren Methode des Tissue Engineerings werden resorbierbare Polymere verwendet. Dabei werden Zellen isoliert, mittels Zellkultur vermehrt (expandiert) und auf resorbierbare Polymergerüste besiedelt. Diese Gerüste geben den aufgebrachten Zellen eine dreidimensionale Struktur vor. Während die Zellen eine extrazelluläre Matrix synthetisieren, sollte das Polymergerüst im Idealfall im gleichen Maße resorbiert werden. Bisher konnte dieses Konzept bei Geweben wie Knorpel, Gefäßen, Herzklappensegeln, Darm, Leber und zahlreichen anderen Geweben experimentell erfolgreich angewendet werden.^{30 31 32 33}

Die entstehenden Konstrukte würden aus körpereigenem Gewebe bestehen und normalen biologischen Mechanismen unterliegen, wie dem des Umbaus, des Wachstums und des Regenerierens. Da es sich um autologen Gewebeersatz handelt, hätten sie theoretisch auch das Potential, sich in das umgebende Gewebe zu integrieren und eine funktionale und lebendige Gewebestruktur zu bilden, dessen Haltbarkeit verlängert wäre. Dieses Konstrukt hätte theoretisch die gleichen funktionellen Eigenschaften wie natürliches Gewebe.

Bei diesen verwendeten Polymeren muss eine gewisse mechanische Stabilität vorhanden sein, ebenso wie eine poröse Oberfläche, in deren Zwischenräume die Zellen einwachsen und sich die extrazelluläre Matrix bilden kann. In einem der ersten Experimente von Shinoka et al. wurde versucht, aus solchem Material ein tissue engineered Herzklappensegel herzustellen. Ein resorbierbares Polymer wurde mit Zellen des gleichen Schafes besiedelt, in dem das besiedelte Segelkonstrukt in posteriorer Position der Pulmonalklappe implantiert wurde.³⁴ Nach 6 Wochen in vivo hatte sich dieses Polymer komplett resorbiert und an derselben Stelle hatte sich ein vitales Gewebe gebildet.³⁵ Als Segelgerüst diente ein kombiniertes Polymer-Gerüst aus PLA (polylactic acid), welches von beiden Seiten mit einem PGA-Gerüst [polyglycolic acid (92% glycolic und 8% lactic acid)] ummantelt war. Das Problem bestand darin, dass sich dieses verwendete Polymer verdickte und zu steif wurde. Somit war es nicht möglich, eine nicht stenotische dreisegelige Klappe aus diesem Gerüstmaterial herzustellen.

Basierend auf diesen Erfahrungen wurden verschiedene Polymergemische ausprobiert,^{36 37} die ausreichende mechanische Eigenschaften aufweisen und sich in gleicher Masse resorbieren können. Ebenso konnte sich eine suffiziente extrazelluläre Matrix bilden.

In einem weiteren Schritt entwickelte die Arbeitsgruppe in Boston ganze dreisegelige Klappenprothesen aus verschiedenen resorbierbaren Polymergerüsten³⁸ und implantierte diese nach der Zell-Besiedlung in ein Tiermodell.³⁹ Durch die Wahl eines neuartigen Polymers und die Verbesserung der Polymereigenschaften wurde versucht, den autologen Zellen ein mechanisches Gerüst zur Verfügung zu stellen, auf denen sie adhärieren und die extrazelluläre Matrix bilden können. Voraussetzung ist hier eine gewisse Oberflächenbeschaffenheit, so dass die Zellen auch während des Blutflusses adhärent bleiben.

Zuerst wurden diese Klappen vorwiegend statisch konditioniert. Anschließend wurde versucht, diese Klappen unter Druck und Flussbedingungen in sogenannten Bioreaktoren zu konditionieren.⁴⁰ Mit Hilfe dieser dynamischen Kultivierung sollte vor der eigentlichen Implantation durch pulsatilem Druck und Fluss eine bessere Adhärenz der Zellen mit Einwanderung ins Innere des Polymers und Bildung der extrazellulären Matrix erreicht werden. Auf diese Art und Weise konnten in-vitro vitale Klappen hergestellt werden, bei denen eine Gewebeentwicklung und eine Polymerresorption im Laufe der Zeit nachgewiesen werden konnten. Diese so hergestellten Konstrukte entsprachen histochemisch als auch biomechanisch einem natürlichen Klappengewebe.³⁸

Zur weiteren Verbesserung der hämodynamischen Eigenschaften wurde versucht, ein naturgetreues Klappendesign nachzuahmen. Um die Form einer dreisegelige Herzklappe zu erhalten, wurde zunächst eine in der Klinik verwendete Polyurethanklappe als Vorlage für die Herstellung einer zweiteiligen Aluminiumform benutzt. Mit Hilfe dieser Form konnte das resorbierbare Polymer gelegt und zu einer Klappe geformt werden.⁴¹ Zur weiteren Optimierung des Klappendesigns wurde eine menschliche Homograft- Herzklappe mittels der Computertomographie erfasst. Aus den daraus ermittelten Daten wurde mit Hilfe eines speziell dafür entwickelten Computerprogramms eine dreidimensionale Rekonstruktion dieser Herzklappe erstellt. Anschließend wurde mit Hilfe der 3-D-Rekonstruktion ein so genanntes Stereolithographiemodell erstellt, woraus schließlich eine naturgetreue Kopie als Negativform gefertigt wurde.⁴²

Mittels dieser hergestellten Form konnte die naturgetreue dreisegelige Herzklappennachbildung konstruiert werden.⁴³

Mit diesem Verfahren war es möglich, eine menschliche Herzklappe nachzubilden und statt eines zylindrischen Konduits, Herzklappengerüste zu verwenden, die der anatomischen Struktur von humanen Herzklappen nachempfunden sind.

Zellquelle

Eine Möglichkeit der Gewebeentnahme stellt die Biopsie dar. Hierbei kann man kleine Gewebeproben der jeweiligen autologen Zellen entnehmen und sie in-vitro kultivieren. Bei einigen Organen und Geweben erweist sich die Entnahme in Form einer Biopsie als extrem schwierig, z.B. bei der Herzklappe. So behilft man sich mit der Verwendung anderer vaskulärer Zellen, insbesondere Fibroblasten und glatter Muskelzellen. Diese sind für die Bildung der extrazellulären Matrix notwendig, welche für die mechanische Beanspruchung der tissue engineerten Herzklappe unabdingbar ist.⁴⁴

Zur Verfügung stehende vaskulären Zellquellen für das Tissue Engineering sind z.B. arterielle Myofibroblasten aus der Aorta.⁴⁵ Auch venöse Myofibroblasten stellen eine Zellquellalternative dar.⁴⁶ Diese werden z.B. aus einem Teil der Vena saphena magna entnommen, so dass nur ein kleiner chirurgischer Eingriff nötig ist.

Eine weitere mögliche alternative Zellquelle Zellen stellen humane mesenchymale Progenitorzellen dar.⁴⁷ Bei den aus dem Knochenmark stammenden Zellen wurde demonstriert, dass sie in der Lage sind, sich in verschiedene Zelllinien mesenchymaler Art wie Knochen, Knorpel und Muskel zu entwickeln.⁴⁸ In Tierversuchen konnten Knochenmarksstammzellen von Schafen, durch Knochenmarkspunktion gewonnen, auf ein Gerüst aufgebracht und in vitro untersucht werden.⁴⁹ Die Arbeitsgruppe Hoerstrup et al. hat in ersten Versuchen Knochenmarkzellen für das Tissue Engineering von dreisehligen Herzklappen verwendet. Dabei wurde eine Differenzierung dieser Zellen zu Myofibroblasten beobachtet. Diese Versuche wurden jedoch noch nicht an Patienten untersucht, sondern in vitro getestet.⁵⁰

Eine weitere Zellquelle wurde in meiner Doktorarbeit evaluiert und stellt die Gewinnung von Zellen aus Nabelschnurgefäßen dar, welche im nachfolgenden Teil ausführlicher erläutert wird.

1.3 Fragestellung

Auf der Suche nach einer geeigneten Zellquelle für das „Tissue Engineering“ von kardiovaskulären Geweben stellen vaskuläre Zellen aus Nabelschnurgefäßen eine potentielle Alternative zu den bisher genutzten Zellquellen dar.

Im ersten Teil meiner Arbeit beschäftigte ich mich mit der Evaluierung der neuartigen Zellquelle. Von besonderer Bedeutung war hierbei die Entwicklung einer Methode zur Kryokonservierung der vaskulären Nabelschnurzellen bzw. der Nabelschnur selbst und die Charakterisierung der gewonnenen unterschiedlichen Zelltypen. Dieser Ansatz hätte den Vorteil, dass man bei einem Kind, dessen Herzklappenfehler pränatal in der Echokardiographie diagnostiziert wurde, die Zellen aus der Nabelschnur nach der Geburt isolieren, kryokonservieren und schließlich zum idealen OP- Zeitpunkt rekultivieren könnte, um ein geeignetes „tissue engineertes“ Konstrukt herstellen zu können.

In einem zweiten Schritt sollte dieses Herzklappengerüst mit den rekultivierten Zellen besiedelt und zu einem funktionsfähigen Gewebekonstrukt sowohl statisch als auch dynamisch in einem Bioreaktor unter kontrollierten Druck- und Flussbedingungen konditioniert werden. Im Anschluss sollten die so hergestellten Klappenkonstrukte histologisch, immunhistologisch, elektronenmikroskopisch und funktionell untersucht werden.

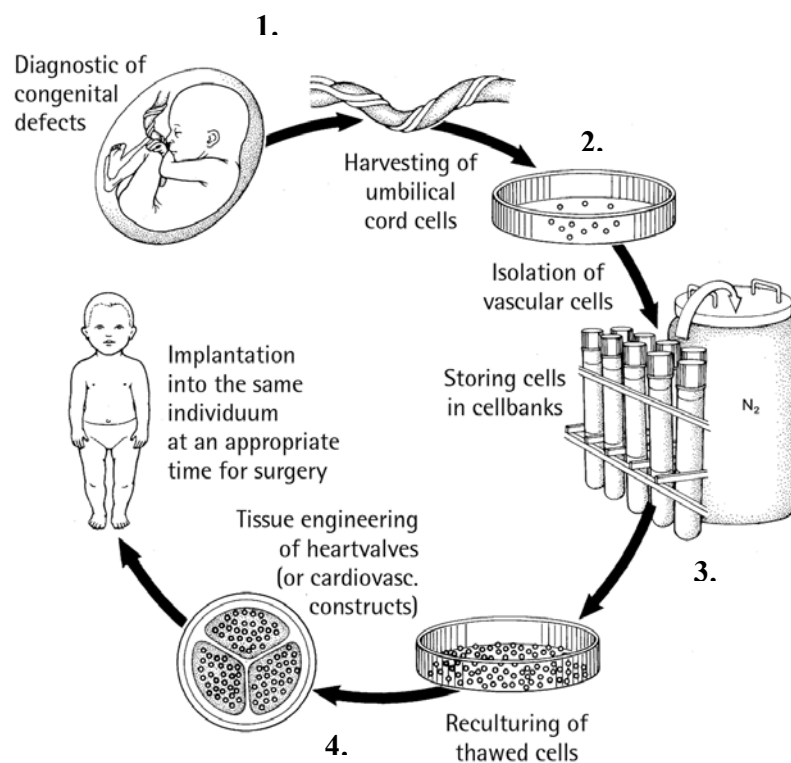


Abb.5

Das Prinzip des Tissue Engineerings von humanen Nabelschnurzellen

1. Zellgewinnung 2. Kultivierung 3. Kryokonservierung 4. Besiedlung auf ein Herzklappenpolymer

Dabei wurden drei möglichen Ansätze der Kryokonservierung untersucht.

1. Die Zellen werden aus der frischen Nabelschnur isoliert und kultiviert (Gruppe A) (Kontrollgruppe) (Abb.6).

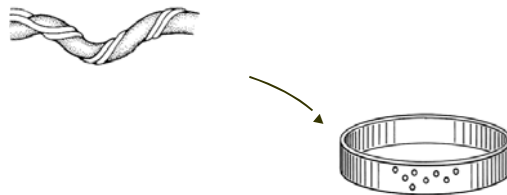


Abb.6

Isolierung der Zellen aus der frischen Nabelschnur

2. Die Nabelschnur wird als Ganzes kryokonserviert. Die Zellen werden nach dem Auftauen isoliert und kultiviert (Gruppe B). (Abb.7)

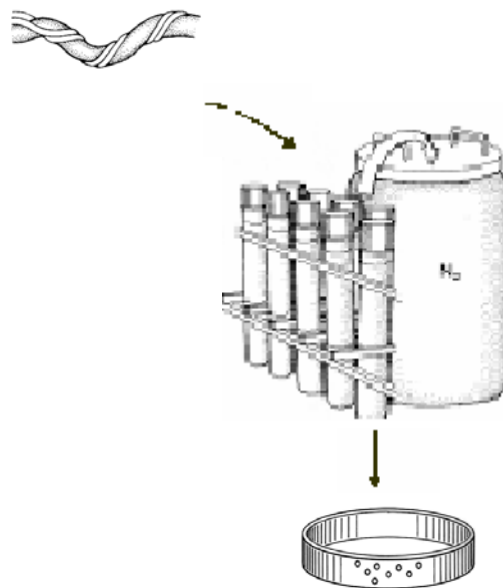


Abb.7

Kryokonservierung der gesamten Nabelschnur und nach dem Auftauprozess Isolierung der Zellen

3. Die Zellen werden gleich aus der Nabelschnur isoliert und dann kryokonserviert.

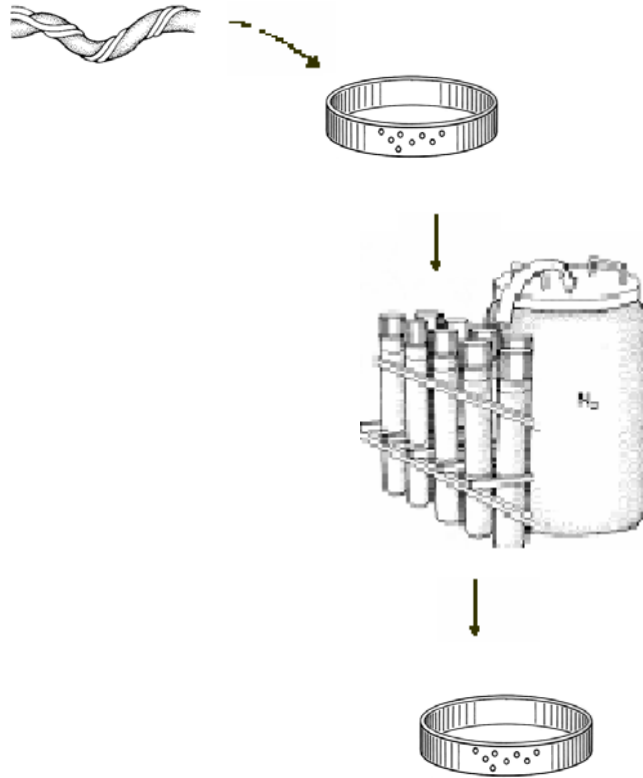


Abb.8

Zellen werden aus der Nabelschnur isoliert und die Zellkultur wird eingefroren

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät Charité genehmigt. Der Ethikantrag liegt der Arbeit bei.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit der Nabelschnur, den Zellkulturen und der in-vitro Konditionierung wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank (Kendro-Heraeus Typ HS12) bzw. in den Inkubatoren (Forma Scientific Forma®Typ 3110) durchgeführt. Im Inkubator herrschte eine Temperatur von 37°C mit zusätzlicher 5% CO²-Begasung und einer Luftfeuchtigkeit von 100%.

Zellgewinnung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Endothelzellen und gemischte Zellkulturen aus glatten Muskelzellen und Fibroblasten -die vereinfacht im weiteren Text als Myofibroblasten bezeichnet werden- aus humanen Nabelschnurgefäßen isoliert.

Für die Kultivierung der Endothelzellen wurde Medium 199 [Gibco Life Technologies, USA] verwendet, dem vor Gebrauch der Wachstumsfaktor bFGF (bovine fetal growth factor [Sigma, USA]), 10% FCS [Sigma, USA] und 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin [Gibco Life Technologies, USA] zugegeben wurde.

Für die Kultivierung von der gemischten Zellkultur aus glatten Muskelzellen und Fibroblasten wurde Duplecco's modified Eagle medium (DMEM) [Gibco Life Technologies, USA], 10% FCS [Sigma, USA,] und 1% Penicillin-Streptomycin-Glutamin [Gibco Life Technologies, USA] benutzt.

Unmittelbar nach der Geburt wurde die Nabelschnur in kühlem PBS-Puffer (Gibco) aufbewahrt und innerhalb von 6 Stunden präpariert. Gemäß dem vorliegenden Ethikbericht wurde eine Einverständniserklärung der Mutter eingeholt.

Zur Isolierung der Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurde eine modifizierte Methode nach Jaffé et al. verwendet.⁵¹ Die Nabelschnur wurde mehrfach mit PBS gespült, um etwaige Kontaminationen mit z.B. Blut zu vermeiden. Anschließend wurde sie auf jegliche Anzeichen von Druckstellen oder Verletzungen an der Oberfläche untersucht. Derartige Stellen wurden entfernt, da diese oft zu Schäden an den inneren Oberflächen führen können. Dies würde zu einer Verunreinigung der Zelllinie mit glatten Muskelzellen oder Fibroblasten führen.

Die Nabelschnur wird mit einem Skalpell in Stücke mit 8-10 cm Länge geschnitten, die Vene mit einer Knopfkanüle katherisiert und anschließend mit PBS gespült.

Für den weiteren Ablauf gab es zwei Ansätze, wie sie im Kapitel „Fragestellung“ beschrieben wurden.

1. Sofortige Kryokonservierung eines Teils der Nabelschnur und Präparation der Zellen aus dem anderen Teil.
2. Sofortige Präparation der Zellen aus der gesamten Nabelschnur und anschließende Aufteilung der Zellen in Kryokonservierung bzw. Kultivierung.

Gewinnung von Endothelzellen

Nach Spülung mit PBS wurde das Gefäßlumen mit 0,2% Dispase (Boehringer, Nr.: 295825) aufgefüllt. Das andere Ende der Nabelschnur wurde zuvor mit einer zweiten sterilen Klemme verschlossen. Zur Ablösung der Zellen wurde das Enzym für 30 Minuten bei 37°C im Lumen belassen, bevor es mit dem Medium 199 neutralisiert wurde.

Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Falcon Röhrchen aufgefangen und bei 1200 rpm und 10°C für 10min zentrifugiert (Eppendorf). Der Überstand wurde mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette (Merck) abgesaugt, das Zellpellet mit 4 ml Medium resuspendiert und auf 4-5 Kulturflaschen (25cm², Falcon) verteilt. Im Anschluss wurden die Flaschen auf je 5ml Medium 199 aufgefüllt und bei 37°C unter den oben aufgeführten Standardbedingungen im Inkubator kultiviert. Dem Zellkulturmedium wurde der Wachstumsfaktor bFGF [basic fetal growth factor, Endkonzentration 10ng/ml, Sigma] zugesetzt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Medienwechsel.

Gewinnung von Myofibroblasten

Die Myofibroblasten wurden über die freipräparierten Arterien aus der restlichen Nabelschnur gewonnen. Das präparierte Gefäß wurde in einer Petrischale (10cm² Durchmesser, Sarstedt) longitudinal aufgeschnitten, in 1mm x 1mm große Stücke geschnitten (mincing technique) und auf weitere Petrischalen verteilt. (Abb. 9)



Abb.9
„Mincing technique“ der mesenchymalen Zellen aus der Nabelschnurarterie

Im letzten Schritt wurden die Gewebestücke mit 10-15ml Zellkulturmedium (DMEM, Gibco) (siehe „Zellkultur“) bedeckt und in einen Inkubator gebracht.

Sobald ein Auswachsen der Zellen aus dem explantierten Gefäßanteil mikroskopisch sichtbar war, wurde das Zellkulturmedium erstmalig gewechselt. Dies geschah durch Absaugen des Mediums mit Hilfe einer Pasteurpipette (Merck) und durch Auffüllung mit 10ml Zellkulturmedium.

2.2 Kryokonservierung

Kryokonservierung der Zellkultur

Die Endothelzellmonolayer wurden mit 10ml PBS gespült und ca. 300µl Enzym Trypsin-EDTA [0.25%, Gibco] wurde in jede Petrischale hinzugegeben. Nach Ablösen der Zellen wurden die Zellen in 5ml Medium 199 suspendiert und in ein 50ml Falconröhrchen [Merck] aufgefangen. Anschließend wurde aus dieser Zellsuspension mittels der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt, um die Zellen danach bei 10°C 10min lang bei 800rpm zu zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 1ml Einfriermedium (Medium 199 mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxide, Sigma) resuspendiert. Die Endothelzellen wurden in den 1ml Kryoröhrchen [Roth] in einer Konzentration von $1,5-2,5 \times 10^6$ Zellen kryokonserviert. Diese wurden mit Hilfe des Icecube 1610 Computer Einfriergerätes auf -50°C und anschließend auf -120°C mit 1°C/min eingefroren. Nach dem Einfriervorgang, der ca. 1½ Stunden dauerte, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff für 12 Wochen aufbewahrt. Bei den Myofibroblasten verfuhr man beim Einfriervorgang in gleicher Weise. Diese wurden aber in einer Konzentration von $0,9-3,5 \times 10^6$ Zellen eingefroren. Als Einfriermedium diente Medium DMEM (Gibco) (siehe „Zellgewinnung“) versetzt mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxide).

Kryokonservierung der gesamten Nabelschnur

Die frische Nabelschnur (8-10cm Länge) wurde durch Spülen mit PBS von Blutresten befreit und in eine Einfriertüte (Fresenius, Homofreeze) mit 150ml Medium199, versetzt mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxide) [Sigma] gebracht. Zuvor wurden die Nabelschnurgefäße über die Knopfkanüle mit dem Medium durchspült. Mit Hilfe des Icecube 1610 Computer Einfriergerätes wurden sie anschließend auf -50°C und dann auf -120°C mit 1°C/min eingefroren. Nach dem 1½ stündlichem Einfriervorgang wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff für 12 Wochen aufbewahrt.

2.3 Auftauprozess

Auftauen der Zellkulturen

Die im Kryoröhrchen [Roth] nach 12wöchiger Kryokonservierung eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad unter vorsichtigem Schwenken max. 2-3min aufgetaut. Unter der sterilen Werkbank wurde die 1ml Zellsuspension mit einer serologischen Pipette (WCP, Berlin) aus dem Kryoröhrchen in die mit Medium gefüllten Zellkulturflaschen pipettiert. Die

aufgetaute Endothelzellsuspension wurde in 5-6 mit 4ml Medium 199 gefüllten 25cm² Flaschen gegeben, die Myofibroblastensuspension in 5-6 mit 9ml Medium DMEM gefüllte 75cm² Zellkulturflaschen.

Diese Zellkulturflaschen wurden im Inkubator unter Standardbedingungen bei 37°C kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte nach 24 Stunden wie bereits beschrieben.

Auftauen der Nabelschnüre

Die kryokonservierten Nabelschnüre wurden zügig in ein mit 37°C vorgeheiztes Wasserbad aufgetaut (ca. 5min) und mit PBS gespült, um das restliche Einfriermedium zu entfernen. Die weitere Endothel- und Myofibroblastenisolierung erfolgte wie im obigen Kapitel „Zellisolierung“ beschrieben.

2.4 Methoden der Zellidentifikation

Identifikation mittels Zellmorphologie

Die Morphologie der Endothelzellen und der Myofibroblasten aller drei Gruppen wurden in einem Auflichtmikroskop (Olympus CK2) bei 100facher Vergrößerung betrachtet, beschrieben und fotografiert.

Identifikation mittels Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde von allen Zellarten, den Endothelzellen und den Myofibroblasten der eingefrorenen Nabelschnur, der eingefrorenen Nabelschnurzellen und der Zellen aus der frisch präparierten Nabelschnur durchgeführt.

Dazu wurden runde Glasplättchen (12mm Durchmesser, WCP) verwendet. Diese wurden auf dem Boden der 6cm² Gewebekulturschalen [Sarstedt] ablegt. Auf diese wurden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen ausgesät.

Diese mit Zellen bewachsenen Deckgläser wurden nach Spülung in PBS mit Methanol (5min., -20°C) und Aceton (10sek., -20°C) fixiert und anschließend mit den antigenspezifischen Erst-Antikörpern (1:50-1:1000 verdünnt in PBS) bedeckt. Bei den Endothelzellen wurden Antikörper gegen die humanen Oberflächenantigene CD 31 (PECAM-1), [Sigma] und den von-Willebrand-Faktor [Chemicon] benutzt. Bei den Myofibroblasten wurden Maus-Erstantikörper gegen humanes α - Aktin (Calbiochem), Kollagen IV (Sigma) und Fibronectin (Calbiochem) verwendet.

Diese wurden für ca. 30-60 min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Spülen mit PBS wurde der an einem Farbstoff (FITC oder TRITC) gebundene spezies-spezifische Antikörper (1:100 verdünnt in PBS) á 40µl auf die Deckgläser gegeben. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit dieser Fluoreszenzfarbstoffe wurde die 60minütige Inkubation in einer abgedunkelten feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Als dazu geführte Kontrollen diente entweder die Phasenkontrastmikroskopie oder die DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) Färbung, um die genaue Lokalisation der nachgewiesenen Proteine bzw. der Zellkerne zu ermöglichen.

Die Darstellung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Olympus 3x61).

Wachstumsverhalten der Zellkulturen

Die Proliferationsrate der Endothelzellen und der Myofibroblasten wurde über 5 Passagen an 6 aufeinander folgenden Tagen untersucht. Die Endothelzellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen und die Myofibroblasten in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen in je eine Vertiefung einer 6-well-Zellkulturmultischale (Nunc) ausgesät und pro Passage 6 Tage kultiviert. Jeden Tag wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und mittels der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter den Standardbedingungen im Inkubator. Die Daten wurden als „standard error of the mean“ angegeben. Signifikanz wurde bei p-Werten kleiner als 0,05 erreicht.

Folgende Unterscheidung wurden vorgenommen:

Gruppe A: Vaskuläre Zellen aus der frischen isolierten Nabelschnur (Kontrollgruppe)

Gruppe B: Vaskuläre Zellen aus der ganzen eingefrorenen Nabelschnur

Gruppe C: Vaskuläre Zellen aus eingefrorenen Nabelschnurzellkulturen

2.5 Herstellung der Polymerkonstrukte

Gerüstmaterial

Für die Besiedlungsversuche hatte sich in verschiedenen Vorversuchen die alleinige Verwendung des resorbierbaren Polymers P4HB (Poly-4-Hydroxy-Butyrate) als günstig herausgestellt. So konnte ein Herzklappengerüst aus lediglich einem resorbierbaren Polymer hergestellt werden, ohne Nahtmaterial oder andere Polymere zu benötigen. Bei diesem Polymer -einer Neuentwicklung der Firma Tephra (USA)- handelt es sich um ein Polyhydroxyalkanoat, welches von Bakterien (*Pseudomonas oleovorans*) synthetisiert wird.⁵² Es ist semikristallin und thermoplastisch mit einem Schmelzpunkt von $T_m = 61^\circ\text{C}$. Zudem besitzt es eine hohe Elastizität und ist gut formbar.

Das Material hat zwar eine hohe Porosität (Porengröße von 180-230 μm) (Abb.10), seine Oberfläche ist hingegen glatt, so dass die Zellhaftung unzureichend ist.

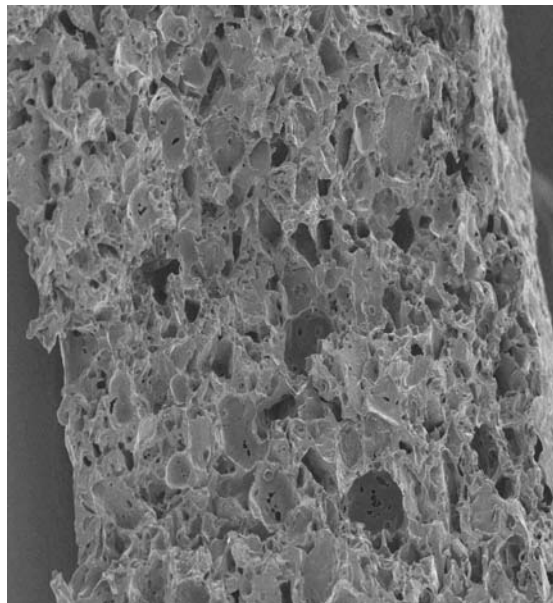


Abb.10

Querschnitt durch das Polymer (P4HB)

Erkennbar ist eine poröse Struktur, in das die Zellen hineinwachsen können.

Um die Adhärenz der Zellen zu erhöhen, wurde die Oberfläche mechanisch aufgeraut. Aus diesem Material konnte die Herzklappe geformt (siehe „Klappenherstellung“) und sterilisiert werden.

Klappenherstellung

Aus den gelieferten Polymerstücken wurden zwei 2x5 cm lange Rechtecke geschnitten. Diese wurden dann nach Vorbild des Stereolithographiemodells und der daraus entwickelten Negativform der Klappe (Abb.11) zur Herzklappe geformt. Aufgrund des niedrigen Schmelzpunktes des Polymers (61°C) und der guten Formbarkeit war dies problemlos möglich (Abb.12).

**A****B****Abb.11**

- A) Negativform der Herzklappe von der Ventrikelseite betrachtet
B) Seitliches Bild der Negativform mit den „Sinus of Valsalva“

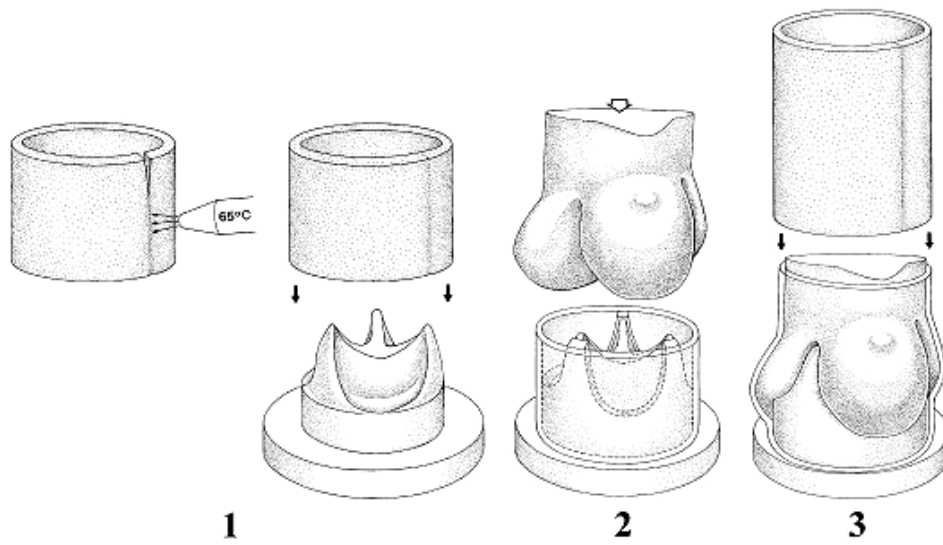


Abb.12

Herstellung der Klappenform aus dem Polymermaterial

1. Zugeschnittene Polymere werden um das Stereolithographiemodell gelegt und durch punktuelle Wärme mittels Lötstab an den Rändern adaptiert
- 2-3. Mittels der Abdrucktechnik wird die Klappe geformt

Um nach dem Besiedlungsvorgang die Klappe mit den adaptierenden Zellen nicht weiter zu berühren, wurde die Klappe, die für die dynamische Besiedlung vorgesehen war, auf einen Silikonadapter aufgenäht. Mit diesem Adapter konnte die Klappe im Bioreaktor aufgesetzt werden, ohne sie zu traumatisieren (Abb.12).

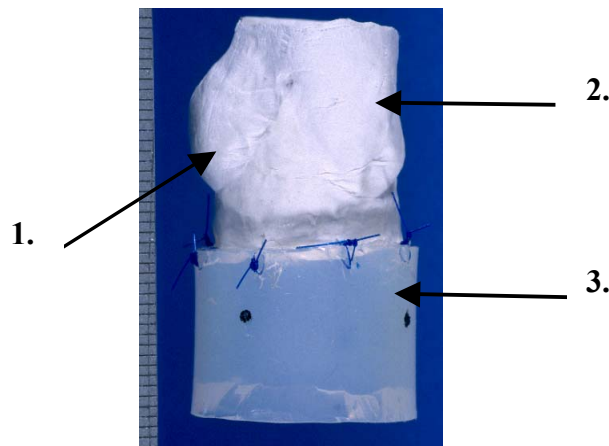


Abb.12

Fertiges Herzklappenkonstrukt mit aufgenähtem Silikonadapter
 1. "Sinus of Valsalva" 2. Konduit 3. Silikonadapter

Die geformten Klappenpolymere wurden von der Firma Vanguard (Berlin) mit Ethylenoxid (EO) bei 37°C kaltsterilisiert.

Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Konstrukte mit FCS (fetalem Kälberserum, Sigma) für 24 Stunden bei 37°C im Inkubator beschichtet. Anschließend wurden sie für weitere 24-48 Stunden in einem Exsikator (KNF Laboport, Kartell) getrocknet.

Zellbesiedlung

Die hergestellten Klappen wurden mit aufgetauten Myofibroblasten der Nabelschnur aus der 3. bis 4. Passage besiedelt. Für die statisch und die dynamisch konditionierten Herzklappengerüste wurden in Parallelversuchen Zellen der gleichen Zelllinie verwandt.

Bei insgesamt 5 Besiedlungstagen wurden pro Besiedlungstag zwei Besiedlungen mit ca. $8 \cdot 10^6$ Zellen durchgeführt. Endothelzellen wurden für diesen Versuch nicht benutzt.

Für die Besiedlung wurden die Zellen in den Zellkulturflaschen durch Trypsin in Suspension gebracht, zentrifugiert und in 1ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit einer Eppendorfpipette auf das in einem verschließbaren Polyethylenbehälter (Merck) liegende Herzklappenpolymer gebracht. Dabei wurde versucht, die Zellen auf alle Seiten der Klappe gleichmäßig aufzubringen. Nach einer Wartezeit von ca. 40 min nach jedem Besiedlungsschritt wurde der Behälter mit 150 ml Medium aufgefüllt, so dass das besiedelte Polymer vollständig mit Zellkulturflüssigkeit bedeckt war. Die Klappe wurde nach fünfmaliger Besiedlung und einer Wartezeit von 7-9 Tagen in den Bioreaktor eingebaut und für 7 Tage in diesem konditioniert. Die statische Klappe wurde als Kontrolle parallel im Inkubator bei den üblichen Standardbedingungen (37°C , $5\%\text{CO}_2$) geführt. Nach insgesamt 3-4 Wochen wurden beide Klappenkonstrukte untersucht.

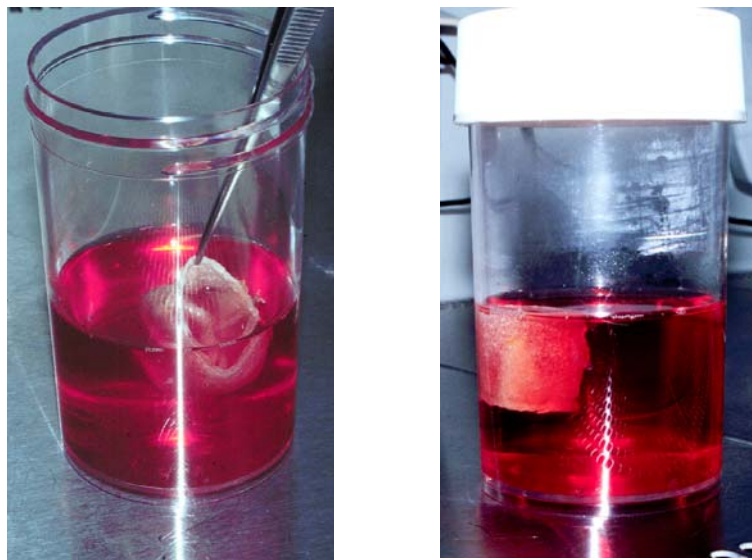


Abb.13

Besiedelte Klappe zur Inkubation im Polyethylenbehälter

Versuchsaufbau

Wie bereits im Kapitel 1 erwähnt, ist die Verwendung eines Bioreaktors für das Tissue Engineering von Konstrukten wichtig, um diese an die in-vitro-Bedingungen kontrolliert heranführen zu können.⁵³ Der Einsatz des Bioreaktors wurde bereits erfolgreich beim Tissue Engineering von autologem Herzklappengewebe angewendet. Bei diesem Experiment lieferte dieses System die dynamischen Zellkulturbedingungen in Form von pulsatilem Fluss und Druck. Diese physikalischen Reize sollten den Zellen den Stimulus geben, in das Polymer einzuwandern und ein Klappengerüst mit entsprechender Extrazellarmatrixbildung herstellen.³⁸

Die Zellkulturbedingungen waren bei den statischen und dynamischen Klappenkonditionierungen exakt vergleichbar. Die Standardbedingungen (37°C, 5%CO₂) wurden übernommen. Dem Medium (DMEM, Gibco) wurde neben 10% FCS (Sigma) und 1% GPS (Gibco) nun auch bFGF (basic fibroblast Groth factor) in einer Endkonzentration von 10ng/ml [Sigma] als Wachstumsfaktor zugegeben.

Das pulsatile Flusssystem ist folgender Maßen aufgebaut:

Der Bioreaktor (1) ist durch einen Silikonschlauch (Cole Parmer, USA) mit dem Zellkulturmedium gefüllten Glasreservoir verbunden (2). Dieses Glasreservoir (Wheaton Inc, USA, Trysining Flask) dient als Überlaufbehälter. Der Antrieb der integrierten pneumo-hydraulischen Membranpumpe erfolgt durch eine Tierbeatmungsmaschine (Dual phase control ventilator, Harvard Apparatus Inc. USA, Model 613). Dieser Teil des Apparates (3) steht außerhalb des Inkubators, um Wärmeentwicklung im Inkubator zu vermeiden. Die In- und Expirationsanschlüsse der Beatmungsmaschine münden über einen Luftdruckschlauch (Cole Parmer, USA) in den Membranpumpenteil des Bioreaktors. Der Bioreaktor selbst ist mit dem mediumgefüllten Überlaufreservoir im Inkubator (4) platziert.

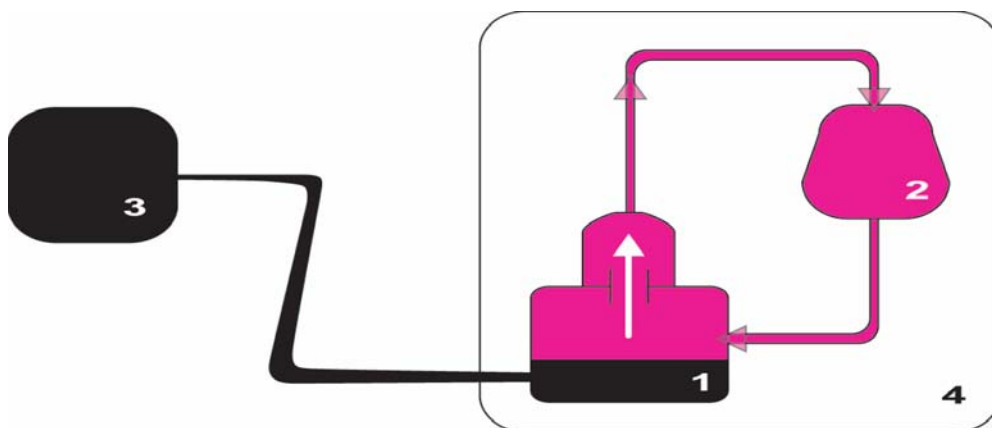


Abb.14 Skizze des Bioreaktors (1) mit Überlaufbehälter (2), Pumpe (3) und Inkubator (4) (rosa: Medium; schwarz: Luft)

**Abb.15**

Versuchsanordnung des Klappenbioreaktors;
1. Bioreaktor 2. Reservoir 3. Schlauchsystem zur Pumpe 4. Inkubator

Diese Herzklappen wurden in diesem pulsatilen Bioreaktorsystem unter Fluss (150ml/min) und einem Druck von ca. 10-15 mmHg konditioniert.⁵⁴ Der Bioreaktor war vollständig transparent, so dass das Öffnen und Schließen der Klappen beobachten werden konnte.

2.6 Evaluation der Konstrukte

Die „tissue engineernden“ Konstrukte wurden nach 7 Tagen aus dem Bioreaktor entnommen und mit den parallel statisch konditionierten Klappen untersucht und verglichen.

Histologie

Hierbei wurde die HE- (Hämatoxylin-Eosin) Färbung benutzt. Die besiedelten Konstrukte wurden in 8% phosphatgepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Diese wurden in 2µm dicke Stücke geschnitten und anschließend gefärbt.

Immunhistochemie

Der immunhistochemische Nachweis erfolgte mittels der APAAP-Methode (alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase) der Firma Biogenics.^{55 56}

Als Erstantikörper dienten folgende:

CD 31- Endothelzellantikörper (Dako)

Dieser monoklonale Maus-Antikörper ist gegen den humanen Oberflächenmarker CD 31 gerichtet, welcher zur Familie der Glykoproteine gehört und in Zellmembranen von Endothelzellen, Lymphozyten und Thrombozyten lokalisiert ist.⁵⁷

Faktor VIII (von Willebrand Faktor) Antikörper (Dako)

Der Faktor VIII (von-Willebrand-Faktor) ist ein in der Maus hergestellte monoklonale Antikörper, der gegen das gleichnamige humane Antigen gerichtet ist. Dieses ist ein multimeres Glykoprotein und wird von Endothelzellen expremiert.

Kollagen I (Novocastra) und IV (Biogenics) Antikörper

Diese monoklonalen Maus-Antikörper sind gegen das jeweilige humane Kollagenantigen gerichtet. Kollagen gehört unter anderem zu einen der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix vaskulärer Gewebe.⁵⁸ Von den insgesamt 19 verschiedenen Kollagenarten ist das Kollagen IV das bekannteste nichtfibrilläre Kollagen⁵⁹ und stellt die Hauptstrukturkomponente der Basalmembran dar.⁶⁰

Fibronektin Antikörper (Dako)

Dieser ebenfalls von der Maus stammende monoklonale Antikörper ist gegen Fibronektin gerichtet, ein für die Entwicklung der extrazellulären Matrix essentielles Protein,⁶¹ da es

Polypeptidketten enthält, die als Bindungsstellen sowohl für die Oberflächenrezeptoren anderer Zellen als auch für Fibrin und Kollagen dient.

α -Smooth Muscle Aktin Antikörper (Dako)

Dieser monoklonale Maus-Antikörper ist gegen humanes Aktin, einem cytoskelettale Protein gerichtet, welches von glatten Muskelzellen synthetisiert wird. Das α -Smooth-Muscle-Aktin ist dabei eine Isoform des Aktins.⁶²

Desmin Antikörper (Dako)

Dieser monoklonale Maus-Antikörper richtet sich gegen humanes Desmin. Desmin ist in Herz-, Skelett- und glatten Muskelzellen lokalisiert.

Elektronenmikroskopie

Diese Untersuchung wurde an der Freien Universität Berlin im Institut der Anatomie Prof. Dr. Shakibaei durchgeführt. Dabei wurden kleine Teilstücke der statisch und dynamisch kultivierten Gewebekonstrukte in Karnofski-Lösung fixiert, in einer aufsteigenden Alkohollösung gewaschen und dehydriert. Anschließend wurden sie in Epon eingebettet, mittels des Reichert Ultracut Gerätes zugeschnitten und mit 2% Uranyl Acetat/Citrat Lösung kontrastiert.

Zur weiteren Untersuchung diente das Transmissionselektronenmikroskop (TEM 10 Zeiss).

Quantifizierung des Kollagen-Gehaltes

Zur quantitativen Kollagenbestimmung wurde der Sircol Collagen Assay (Biocolor, Belfast) verwendet.

Mit dieser Methode wird nur der lösliche Kollagenanteil bestimmt. Aus diesem Grund wurden die Proben mit 0,5M Essigsäure behandelt, um auch den unlöslichen Teil zu extrahieren.

Ca. 0,5g Gewebe wurde in 1ml 0,5M Essigsäure für 24-48 Stunden bei Raumtemperatur resuspendiert, über eine Gaze filtriert, bei 13.000rpm zentrifugiert und mit 2M NaCl präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das entstandene Pellet in 0,5M Essigsäure gelöst und 100µl des Überstandes für den Assay benutzt.

Bei dem Test wird das Gesamtkollagen quantifiziert und mit einer Standard-Absorptionskurve verglichen.

Die Farbstoffe binden spezifisch an die Moleküle, welche fotometrisch bestimmt werden. Die gebundenen Farbstoffe zur Kollagenbestimmung absorbieren im Bereich von 540nm. Die Menge an gebundenem Farbstoff ist proportional zur Menge des zu bestimmenden Kollagens. Die Ergebnisse wurden zwischen den konditionierten Herzklappen und den statisch geführten Kontrollen mittels des Mann-Whitney Tests statistisch ausgewertet.

Die Regressionsgleichung der ermittelten Standard-Absorptionskurve wurde mittels der Microsoft Excel Software erstellt.

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von kryokonservierten Zellen und dem besiedelten Herzklappenkonstrukten

Die Untersuchungen mittels quantitativer fluoreszenzmikroskopischer Imaging-Verfahren wurden in Zusammenarbeit mit der physiologischen Abteilung der Freien Universität Berlin (Arbeitsgruppe Prof. Kübler) durchgeführt.

Imaging der intrazellulären Calcium (Ca^{2+} -) Konzentration

Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Verfahren wurden Endothelzellen und Myofibroblasten im Nativzustand, nach Kryokonservierung sowie nach erfolgreicher Klappenbesiedelung hinsichtlich ihrer zellulären Homöostase und ihrer Fähigkeit zu zellphysiologischen Reaktionen untersucht.

Mittels der fluoreszenztechnischer Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration mit Hilfe der Fura-2-Ratio-Imaging-Technik⁶³ wurde die $[\text{Ca}^{2+}]$ Antwort auf Histaminstimulation in kryokonservierten, re-kultivierten Endothelzellen und Myofibroblasten von Nabelschnüren, sowie in besiedelten Herzklappen untersucht.

Dazu wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläser (12mm, WCP) (siehe „Kulturbedingungen“) verwendet. Diese und ein kleines Stück der besiedelten Herzklappe (ca. 2 cm²) wurden mit 10μM Fura-2 in PBS^{Mg²⁺/Ca²⁺-}Lösung 25min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 1ml PBS zweimal gespült und bei 340/ 360/ 380 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit 5μl Histamin (Endkonzentration = 10μM) stimuliert.

Bei Belichtungszeiten von 50msek. erfolgte die Auswertung schließlich am PC.

3. Ergebnisse

3.1 Zellkultur

Zellgewinnung

Glatte Muskelzellen und Fibroblasten konnten nicht auf enzymatischer Weise getrennt werden, so dass sie ein Zellgemisch darstellen und im folgenden als Myofibroblasten bezeichnet werden. Eine ausreichende Menge an diesen sogenannten Myofibroblasten ließ sich mit der mechanischen Isolierungsweise, der sog „mincing technique“, erzielen. Die Zellausbeute konnte gesteigert werden, in dem die Explantatstücken aus der Arterie statt aus der Vene entnommen wurden und indem diese Explantatstücke kleiner als 1mm² präpariert wurden. Die Endothelzellen ließen sich in ausreichender Menge mit der enzymatischen Methode mittels Diapase aus der Vene gewinnen. Ihre Zellausbeute konnte durch Inkubation bei 37°C gesteigert werden.

Morphologie der gewonnen Zellen

Die auflichtmikroskopischen Untersuchungen der Endothelzellen und der Myofibroblasten aus der frischen (Gruppe A), eingefrorenen (Gruppe B) Nabelschnur oder aus der eingefrorenen Nabelschnurzellkultur (Gruppe C) ergaben hinsichtlich der Morphologie keine Unterschiede.

24 Stunden nach der Isolierung ließen sich unter dem Mikroskop (Olympus CK2) adhärierte Endothelzellen erkennen (Abb.16).

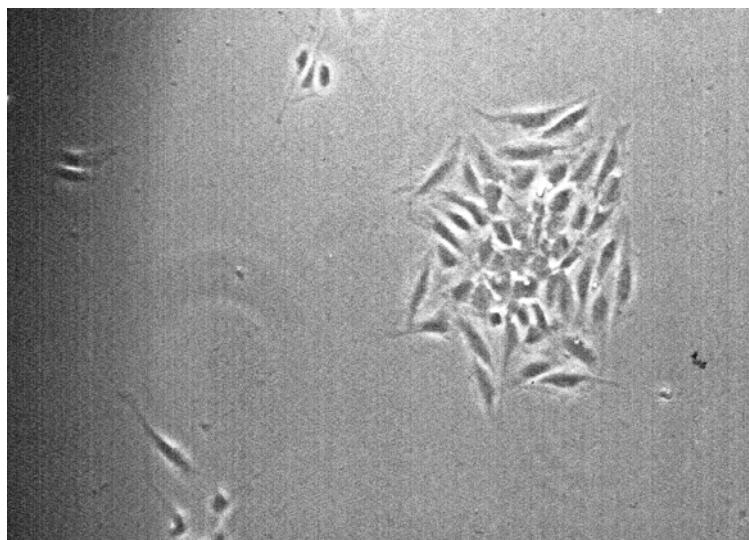


Abb.16

Adhäreente Endothelzellen 24h nach Isolation

Nach ca. 2-3 Tagen war bei den Endothelzellen der Gruppe A und C mikroskopisch eine konfluente, einschichtige Zellschicht sichtbar. Die Endothelzellen der eingefrorenen Nabelschnur (Gruppe B) waren erst nach ca. 12-14 Tagen konfluent.

Die konfluenten Endothelzellmonolayer ließen das typische mikroskopisch sichtbare pflastersteinartige Muster erkennen (Abb.17).

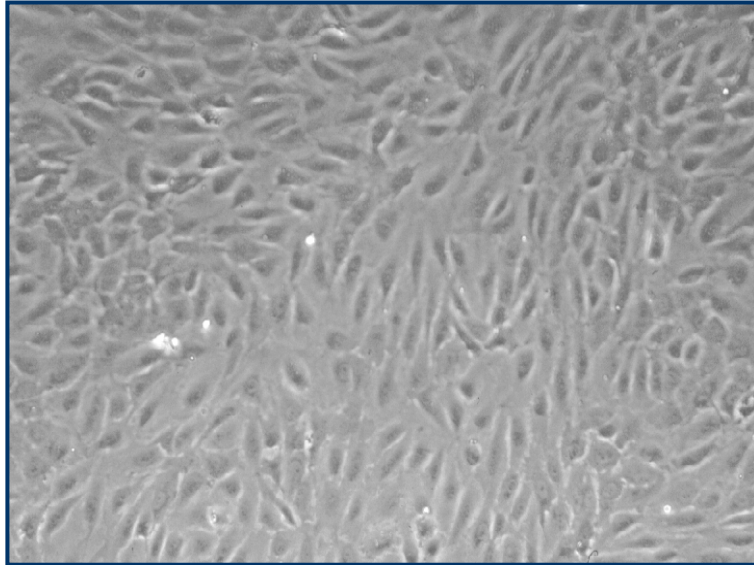


Abb.17

Konfluente Endothelzellmonolayer mit dem typischen pflastersteinartigen Muster

Das Auswachsen der Myofibroblasten aus den Explantatstücken war nach ca. 1-2 Wochen unter dem Mikroskop erkennbar. (Abb.18)

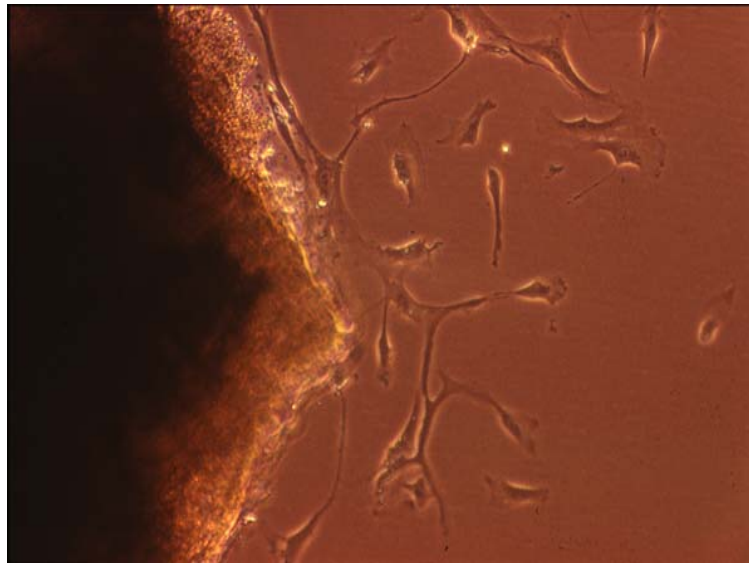


Abb.18
Auswachsen der Zellen aus dem Gewebe

Erst nach ca. 3-4 Wochen war bei den Myofibroblasten ein deutlicher Zellrasen zu beobachten, der unter dem Mikroskop das für diesen Zelltyp typische fischschwarmartige Muster zeigte. (Abb19)

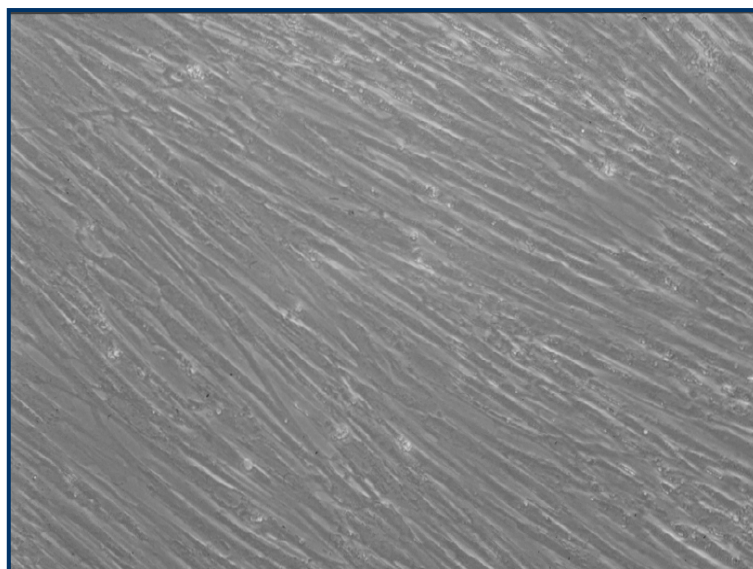


Abb.19
Konfluente Myofibroblasten mit typischem „fischschwarm“ ähnlichem Muster

Identifikation mittels indirekter Immunfluoreszenz

Mit Hilfe spezifischer Marker ließen sich die Endothelzellkulturen nachweisen. Hier konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen dargestellt werden.

Der Oberflächenmarker CD 31 zeigte in den Endothelzellkulturen aller drei Gruppen eine starke homogene Signalintensität (Abb.20). Bei der Markierung mit dem von-Willebrand Faktor ließ sich das typische punktförmige zytoplasmatische Muster erkennen. Als Kontrolle wurde die DAPI (Diamin-Phenylindol-Dihydrochlorid) Färbung für die genaue Lokalisation der Proteine verwendet. (Abb.21)

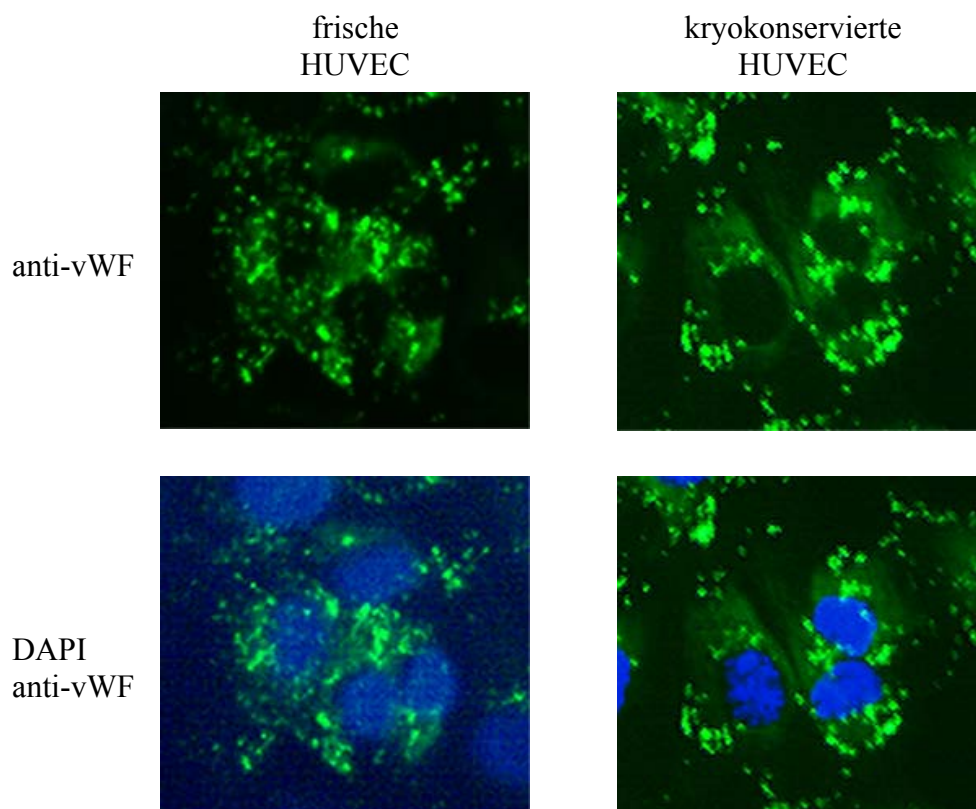


Abb.20

Von-Willebrandt-Faktor in der indirekten Immunfluoreszenz

FrISChe und kryokonservierte Endothelzellmonolayer (H UVEC, human umbilical vein endothelial cells) wurden in der 3. Passage mit monoklonalem Anti-von-Willebrandt-Faktor-Antikörpern (grüne Fluoreszenz) markiert und mit DAPI als Kontrolle (blaue Fluoreszenz) dargestellt. In frischen und eingefrorenen HUVECs: Darstellung der zytoplasmatischen Lokalisation des von-Willebrandt-Faktors und des Zellkerns. (bar 100µm)

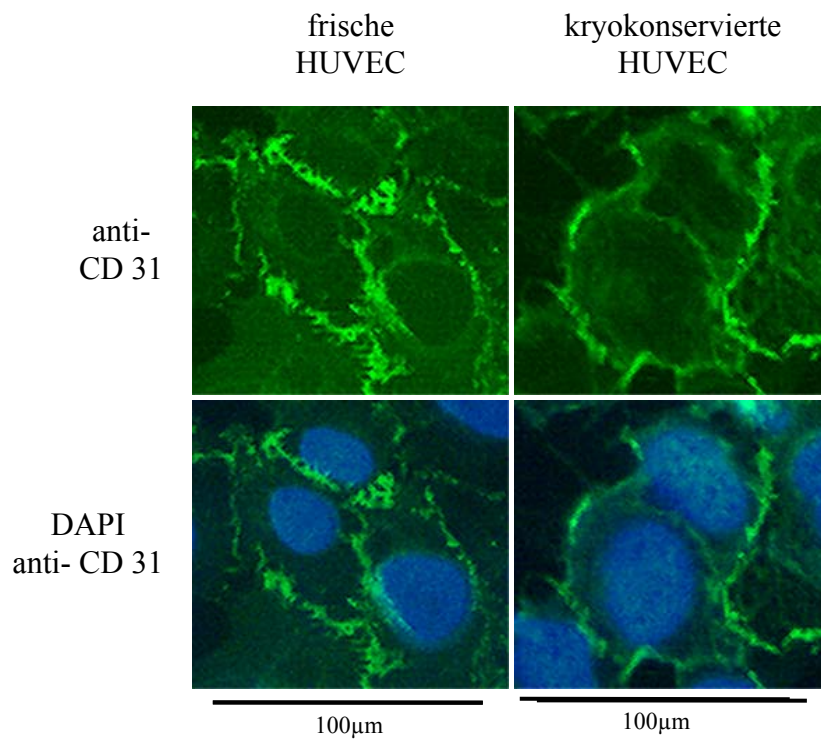


Abb.21

Konfluente frische und kryokonservative Endothelzellen der 3.Passage, markiert mit dem CD 31 Marker (grüne Fluoreszenz) und der DAPI Anfärbung als Kontrolle; starke Signalintensität beider Gruppen. In frischen und eingefrorenen HUVECs Darstellung von CD 31 und des Zellkerns. (bar 100µm)

Bei den Myofibroblasten zeigte sich das α -Smooth Muscle Aktin als fibrilläre Stränge (Abb.22). Dabei waren keine Unterschiede bezüglich der frischen und kryokonservierten Myofibroblasten erkennbar. Kollagen IV (Abb.23) und Fibronektin (Abb.24) ließen sich an der Zellperipherie nachweisen. Auch Kollagen I und Elastin zeigten eine hohe Signalintensität. Die aus der kryokonservierten Nabelschnur stammenden Myofibroblasten werden nicht untersucht, da eine Isolierung dieser Zellen nicht möglich war.

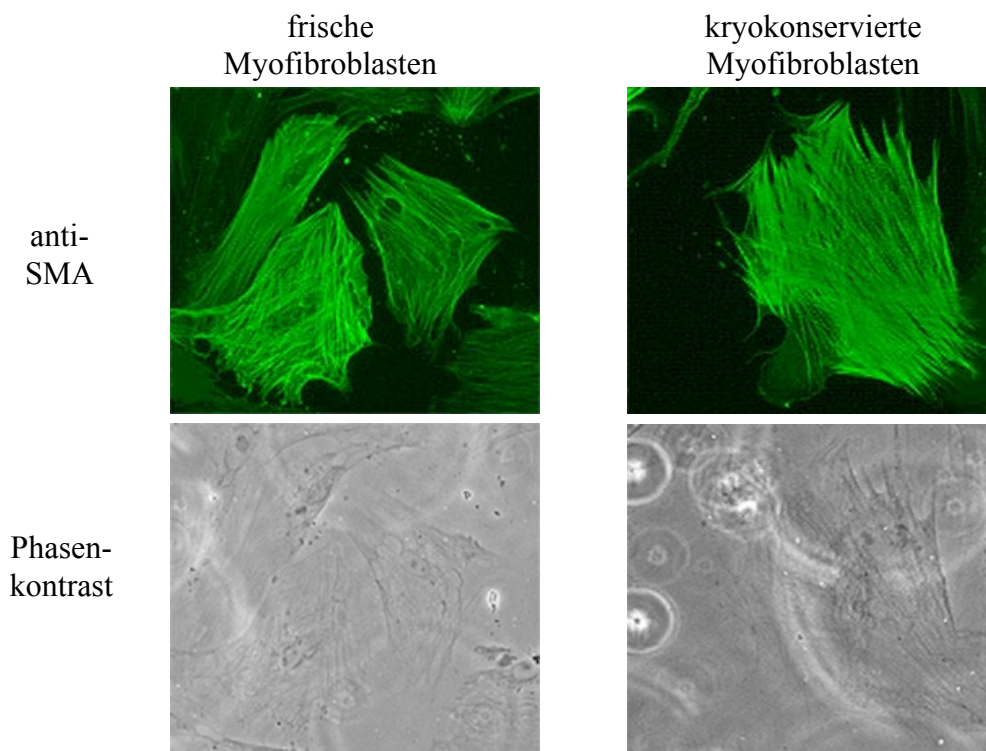


Abb.22

Darstellung von endogenem α -Aktin

Konfluente Myofibroblasten der dritten Passage wurden mit monoklonalem Anti- α -Aktin Antikörpern markiert (grüne Fluoreszenz). Als Kontrolle diente das Phasenkontrastbild derselben Zellen. In frischen und eingefrorenen Myofibroblasten Darstellung der fibrillären Lokalisation des α -Aktin. (bar 100 μ m)

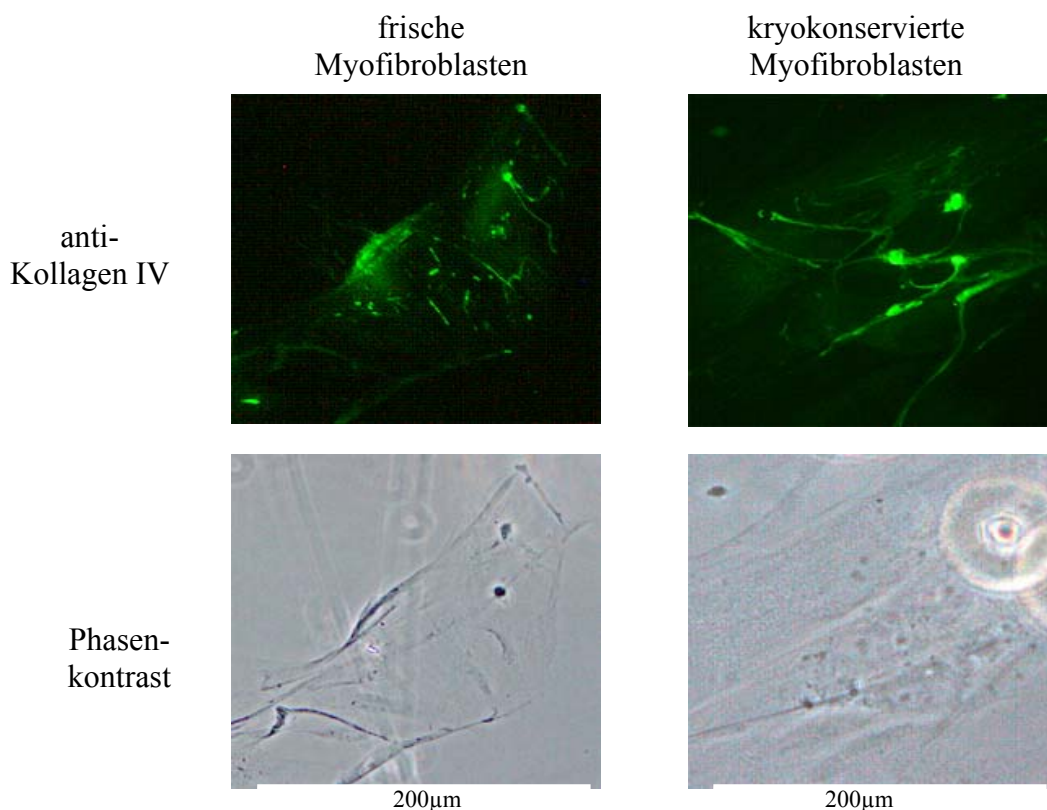


Abb.23

Darstellung von Kollagen IV. Konfluente Myofibroblasten der dritten Passage wurden mit monoklonalem Anti-Kollagen-IV Antikörpern markiert (grüne Fluoreszenz). Als Kontrolle diente das Phasenkontrastbild. (bar 200µm)

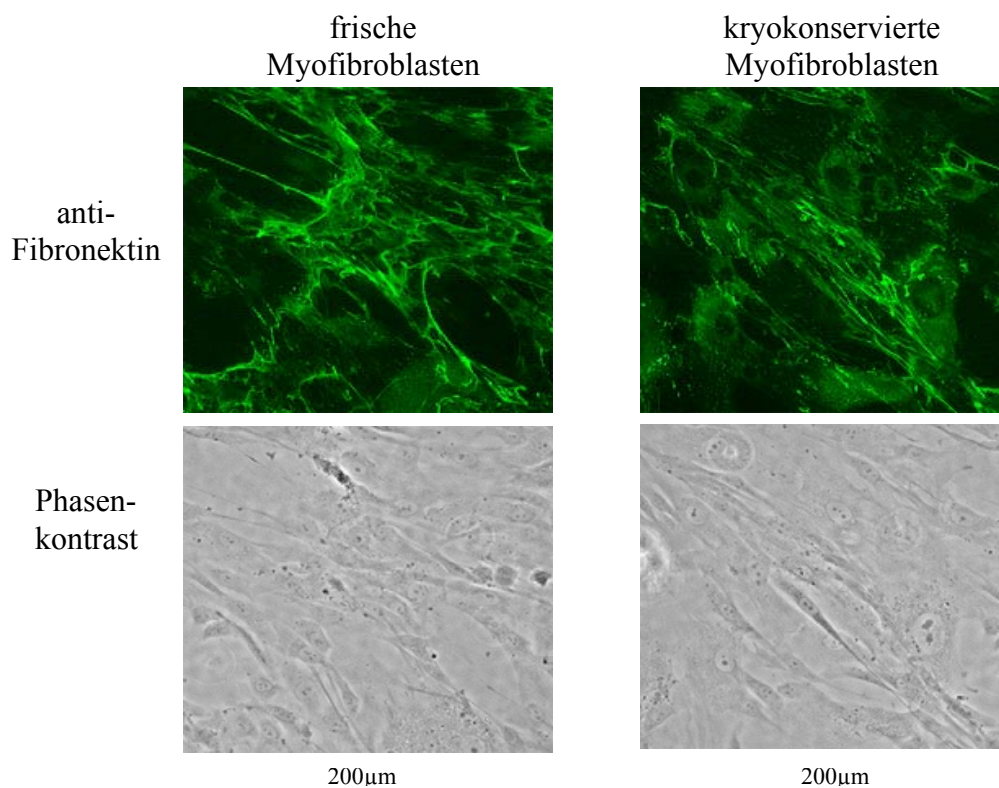


Abb.24 Darstellung von Fibronektin als dünne Fasern. Konfluente Myofibroblasten der dritten Passage wurden mit monoklonalem Anti-Elastin Antikörpern markiert (grüne Fluoreszenz). Als Kontrolle diente das Phasenkontrastbild.

Wachstumsverhalten der Zellkulturen

Das Wachstumsverhalten der vaskulären Zellen der frisch präparierten Nabelschnur (Gruppe A), der eingefrorenen Nabelschnur (Gruppe B) und die eingefrorenen Nabelschnurzellkulturen (Gruppe C) sind in der Abbildung 24 (Endothelzellen) und in Abbildung 25 (Myofibroblasten) zusammengefasst.

Die Gruppe A (Zellen aus der frischen Nabelschnur) diente als Kontrollgruppe.

Gruppeneinteilung:

Gruppe A: Vaskuläre Zellen aus der frischen Nabelschnur (Kontrollgruppe)

Gruppe B: Vaskuläre Zellen aus der eingefrorenen Nabelschnur

Gruppe C: Vaskuläre Zellen aus eingefrorenen Nabelschnurzellkulturen

Die Proliferationsrate der Endothelzellen der frisch isolierten Nabelschnur (Gruppe A, n=14), der eingefrorenen Nabelschnur (Gruppe B, n=3) und der eingefrorenen Nabelschnurzellkulturen (Gruppe C, n=8) wurden in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen in den 6 well-Kulturplatten ausgesät (siehe Methodenteil) und über 6 Tage kultiviert. Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse der 3. Passage, da die 3.- 4. Passage für die Besiedlung der Herzklappenpolymere benutzt werden sollten.

Die Endothelzellen der frisch isolierten Nabelschnur (Gruppe A) wurden als Kontrolle angesehen und mit den anderen Gruppen verglichen. Die Zellen der Gruppe A zeigten eine konstant steigende Proliferation über 6 Tage mit einem Maximum am 4.Tag mit einer Zellzahl von 3.1×10^5 .

Die Endothelzellen der eingefrorenen Nabelschnur (Gruppe B) konnten zum Großteil nicht aus der wieder aufgetauten Nabelschnur isoliert werden. In der dennoch kultivierten Endothelzellenkultur der Gruppe B befanden sich nach 4-5 Tagen hauptsächlich abgestorbene Zellen. Nur bei einem kleinen Anteil (n=3) der aus den aufgetauten Nabelschnüren isolierten Zellen konnte ein Wachstum bis zur 3. Passage beobachtet werden. Diese zeigten am 5.Tag ein Maximum von $2,1 \times 10^5$ Zellen. Die Gruppe C -eingefrorene Endothelzellkulturen- zeigte ein ähnliches Proliferationsverhalten wie Gruppe A. Die Werte wurden als „standard error of the mean“ angegeben.

Für Endothelzellen der Gruppe B ergab sich zur Kontrollgruppe (Gruppe A) ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p < 0.005$ am Tag 1 und ein p- Wert von < 0.043 am Tag 4. Die Gruppe C (eingefrorene Zellkultur) zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe A (frische Nabelschnurzellen).

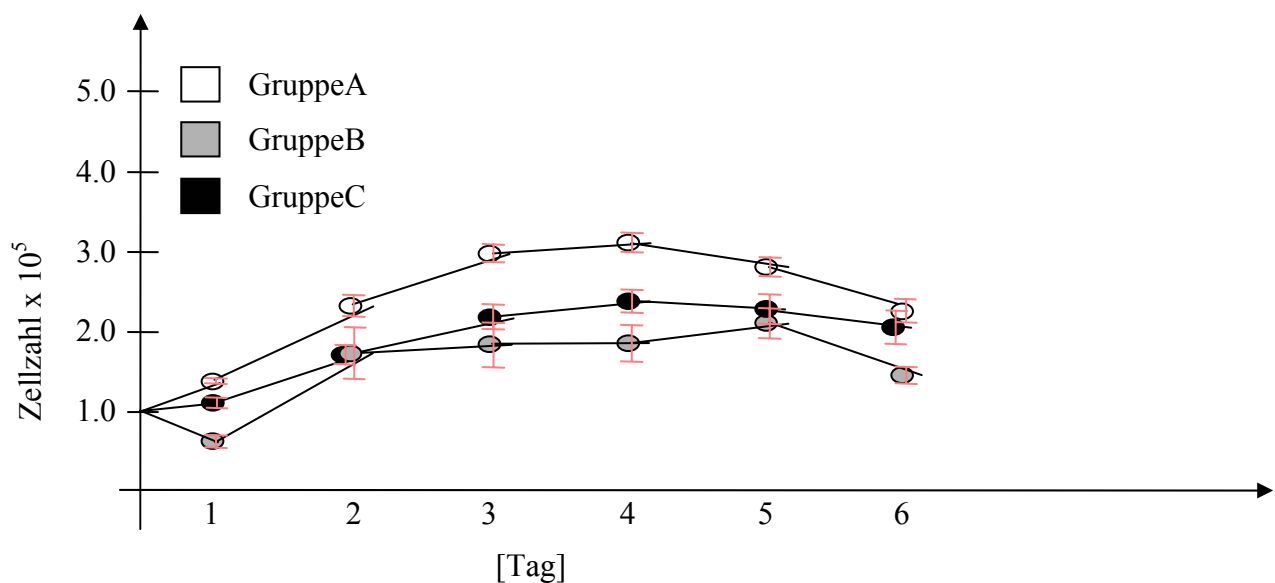


Abb.25

Wachstumskinetik der Endothelzellen aus humanen Nabelschnüren

Die dritte Passage der Endothelzellen isoliert aus frischen (Gruppe A, n=14), kryokonservierten Nabelschnüren (Gruppe B, n=3) und aus kryokonservierten Zellkulturen (Gruppe C, n=8). Die Zellen wurden auf 6 Plattenvertiefungen in einer Konzentration von $1,0 \times 10^5$ Zellen ausgesät und über 6 Tage kultiviert. Jeden Tag wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Proliferationsrate der Myofibroblasten der frisch isolierten Nabelschnur (Gruppe A), der eingefrorenen Nabelschnur (Gruppe B) und der eingefrorenen Nabelschnurzellkulturen (Gruppe C) wurden in einer Konzentration von 5.0×10^4 Zellen in den 6 well-Kulturplatten ausgesät (siehe Methodenteil) und über 6 Tage kultiviert. Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse der 3. Passage, da die 3.- 4. Passage für die Besiedlung der Herzklappenpolymere benutzt werden sollten. Als Kontrollgruppe diente die Gruppe A (Myofibroblasten der frischen Nabelschnur).

Die Gruppe B wurde in der Graphik nicht berücksichtigt, da die Zellen sich nicht aus der eingefrorenen Nabelschnur isolieren ließen. Für die Gruppe B ergab sich mit einem p-Wert von <0.052 für den Tag 6 kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

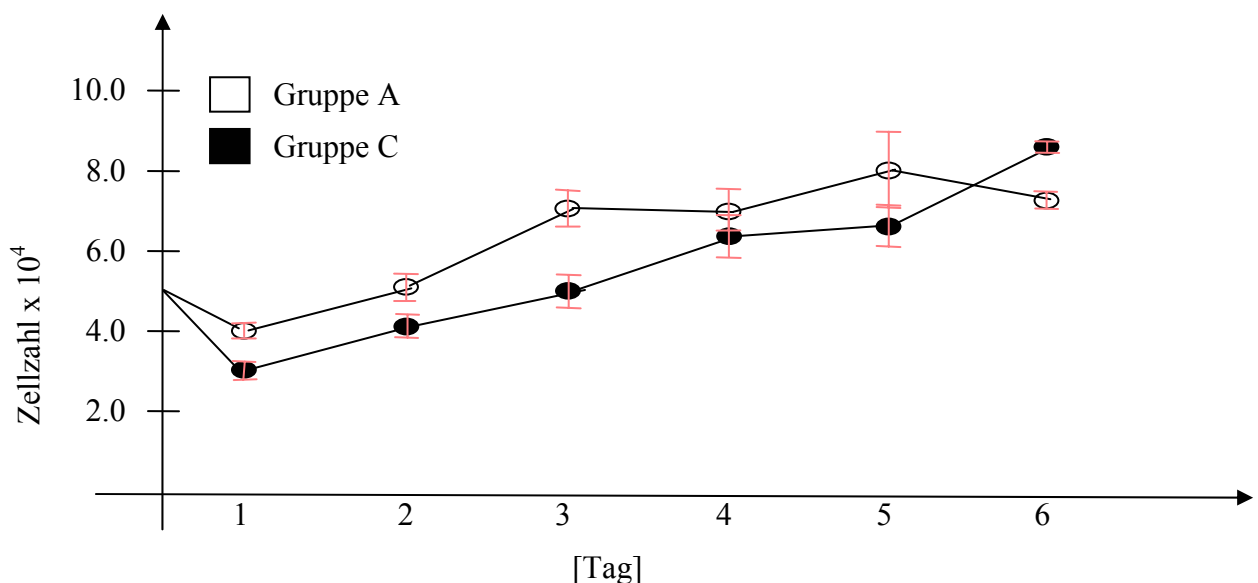


Abb.26

Wachstumskinetik der Myofibroblasten aus humanen Nabelschnüren

Dargestellt ist die dritte Passage der Zellen isoliert aus frischen (Gruppe A, $n=7$) und aus kryokonservierten Zellkulturen (Gruppe C, $n=5$). Gruppe B wurde in der Graphik nicht berücksichtigt, weil keine Zellen aus dem Explantatstück auswuchsen. Die Daten wurden als „standard of the mean“ dargestellt. $P < 0,051$ am 6.Tag ergab keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Die eingefrorenen Zellen der Nabelschnurgefäße zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die frisch präparierten Zellen. Basierend auf diesem Ergebnis stellen diese eingefrorenen Zellen eine potentielle Zellquelle für das Tissue Engineering von Herzklappen dar.

3.2 Herstellung der Polymerkonstrukte

Gerüstmaterial

Aufgrund des Herstellungsverfahrens wurde das verwendete Polymer P4HB (Poly-4-Hydroxybutyrate) mit einer glatten, nicht porösen Oberfläche geliefert.

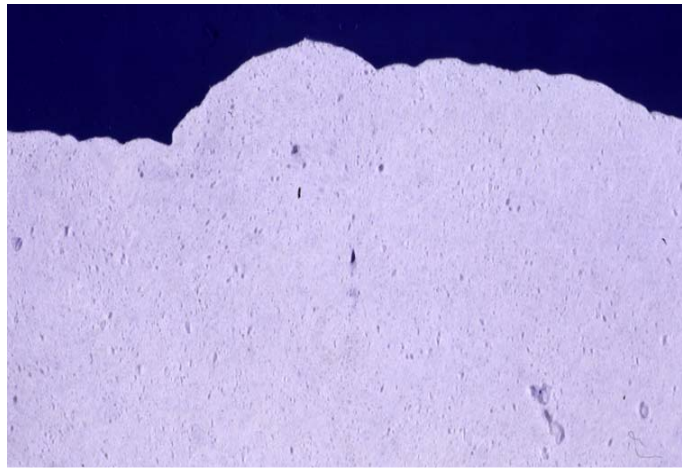


Abb.27

Eine makroskopische Aufsicht des P4HB Polymers (Ausschnitt)

Die innere Struktur des Polymers dagegen war porös, die einzelnen Löcher standen miteinander in Verbindung, in denen die Zellen einwandern konnten.

Das Aufrauen wirkte sich positiv auf die Zelladhäsion aus. Durch diese Schritte wurde das Einwachsen der Zellen in das Polymer erleichtert.

So konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung des hydrophoben Polymermaterials mit fetalem Kälberserum scheinbar die Adhärenz der Zellen fördert. Sie scheinen dadurch in der Lage zu sein, in das Polymer einzuwachsen und ihre eigene Matrix zu bilden. Im Gegensatz zu den beschichteten Polymerkonstrukten war die Adhärenz auf den unbeschichteten schlecht. Bei diesen konnte nur ein spärliches Zellwachstum beobachtet werden.

Klappenherstellung

Mittels des CT (Computertomographie) Scans und des Softwarecomputerprogramms (AMIRA-ANAPLAST) hergestellte Stereolithographymodel und des daraus entwickelten Silikonmodels konnte weitgehend das Design einer Aortenklappe hergestellt werden.

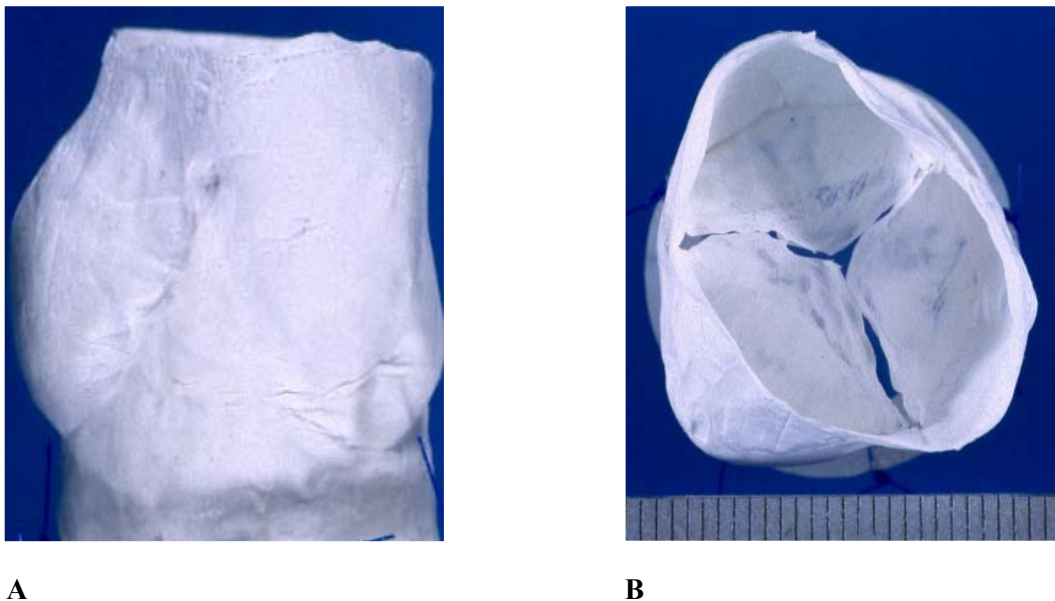


Abb.28

Hergestelltes Klappenkonstrukt aus porösem P4HB
-A. Seitliche Ansicht B. Aortale Ansicht mit Blick auf die Segel

Durch die Bildung der „Sinus of Valsalva“ sollten die hämodynamischen Eigenschaften der Klappe verbessert werden. Diese Klappe konnte ohne jegliches Nahtmaterial hergestellt werden, so dass ein weitgehend naturgetreues anatomisches Konstrukt einer menschlichen aortalen Herzklappe hergestellt werden konnte.

Klappenbesiedlung

Beim Besiedlungsvorgang war eine Pause zwischen den Besiedlungsvorgängen sehr wichtig, um eine bessere Adhärenz der Zellen auf der aufgerauten und mit fetalem Kälberserum beschichteten Polymeroberfläche zu ermöglichen. Das Auswaschen der nicht adhärenen Zellen nach Zugabe des Mediums konnte dadurch verhindert werden. Nach 5 Besiedlungstagen mit je 2 Besiedlungen konnte bereits makroskopisch eine gelblich schimmernde Oberfläche beobachtet werden. Dieses wies aufgrund zahlreicher Beobachtungen auf ein üppiges Zellwachstum hin.

Mit dieser Technik war es möglich, das Polymer mit einer ausreichend hohen Zellzahl zu besiedeln und ein Wachstum der Zellen zu ermöglichen.

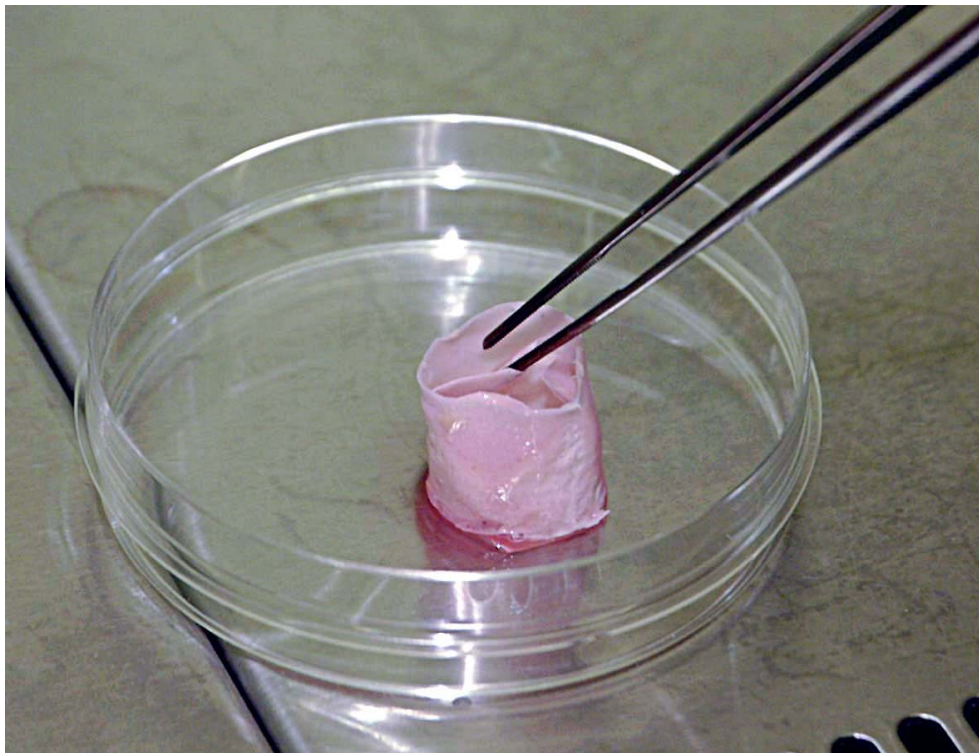


Abb.29

Besiedelte Klappe mit gelblich schimmernder Oberfläche. Pinzettenspitze zeigt auf die Segel.

Bioreaktor und dynamische Zellkonditionierung

Durch die dynamische Konditionierung des besiedelten Polymers mittels eines "Bioreaktors" konnte ein pulsativer Fluss hergestellt werden, der die Gewebeentwicklung, d.h. die extrazelluläre Matrixproduktion in-vitro induziert. So konnten vitale autologe Klappenkonstrukte in-vitro hergestellt werden. Bei der Konditionierung sind keine Lecks aufgetreten. Der Bioreaktor wies keine Defekte auf.

Aufgrund des transparenten Acrylmaterials des Bioreaktors ist zudem ein Beobachten der Klappenbewegungen möglich gewesen. Auch konnten Farbveränderungen und Aussehen des Mediums und damit eventuelle Kontaminationen beobachtet werden.



Abb.30

Im Bioreaktor eingebrachtes Klappengerüst (mit Pfeil gekennzeichnet)

3.3 Evaluierung der Konstrukte

Insgesamt wurden die statischen (n=7) mit den im Bioreaktor (n= 6) dynamisch konditionierten besiedelten Herzklappenkonstrukte verglichen.

Histologie und Immunhistochemie

Lichtmikroskopisch findet man in der Hämatoxilin-Eosin (HE-) Färbung (Abbildung 31) der dynamisch im Bioreaktor konditionierten Klappen auf beiden Oberflächen mehrschichtige Zellschichten von mesenchymalen Zellen. In der Tiefe erkennt man das doppelbrechende Polymermaterial, in das ein Einwachsen der Zellen beobachtet wird. Diese Zellen mit längsovale Zellkern stehen mit ihren Zellausläufern miteinander in Berührung.

Die statischen belassenen Kontrollen dagegen zeigen auf der Oberfläche nur ein- bis zweischichtige Zellreihen. Eine konfluente Zellschicht war nicht erkennbar. Die Zellkerne weisen eine eher runde bis ovale Form auf. Im Inneren des Polymers sind keine bis nur wenige Zellen erkennbar.

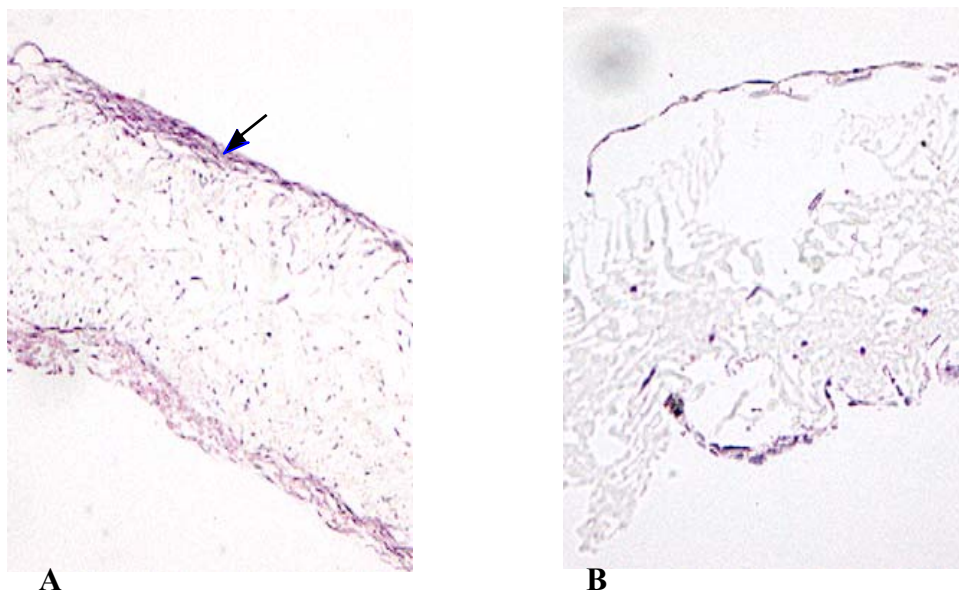


Abb.31

- A.** HE-Färbung der dynamisch im Bioreaktor konditionierten Klappen (Vergrößerung 4x). Es sind mehrschichtige Zellschichten auf den Oberflächen des Polymers und ins Innere einwachsende Zellen erkennbar.(Pfeil)
- B.** HE-Färbung der statisch geführten Klappen (Vergrößerung 10x). Nur vereinzelte ein- bis zweischichtige Zellschichten und kaum ein Wachstum ins Innere des Polymers ist sichtbar.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der tissue engineerten Konstrukte zeigten positive Ergebnisse für Kollagen I (Abb. 32), Kollagen IV (Abb.33), Fibronectin (Abb.34), Desmin und α -Aktin (Abb.35). Auch sind die Ergebnisse bei den dynamisch konditionierten Klappen stärker positiv als bei den statisch belassenen Kontrollen (Abb.36) (Abb.37). Für CD 31 und Faktor 8 zeigten die Untersuchungen negative Ergebnisse bei beiden Klappenarten (statisch und dynamisch).

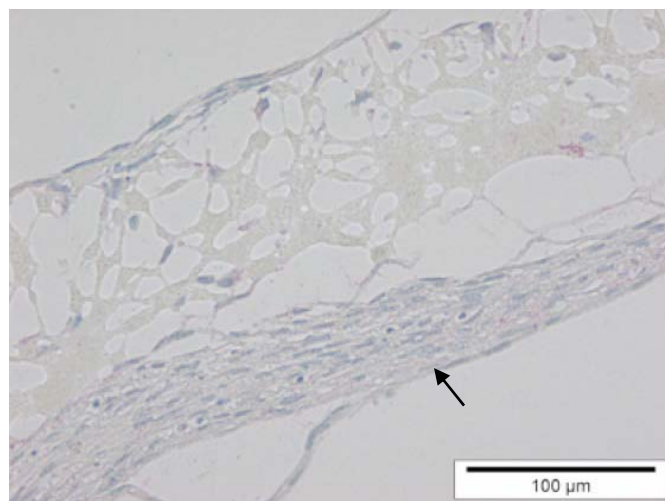


Abb.32

Positiver Kollagen I Nachweis der dynamisch geführten Klappen in der immunhistochemischen Färbung (grau: Polymer; lila: Kollagen I)

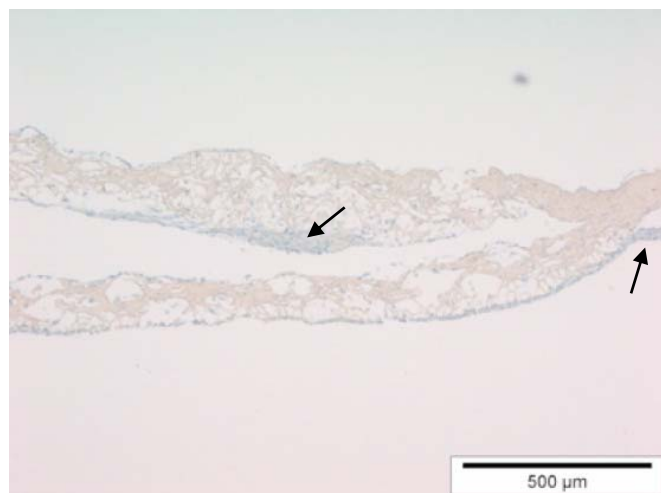


Abb.33

Positiver Kollagen IV Nachweis der dynamisch geführten Klappen in der immunhistochemischen Färbung (grau: Polymer; lila/ blau: Kollagen IV)

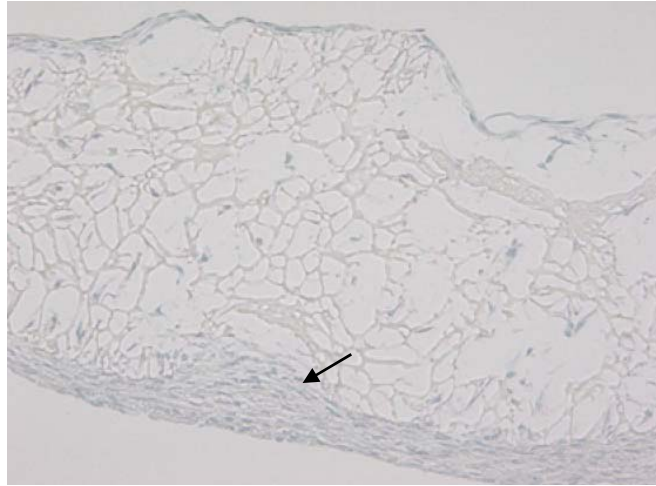


Abb.34

Positiver Fibronectin Nachweis der dynamisch geführten Klappen in der immunhistochemischen Färbung. Das Polymer ist teilweise bereits resorbiert. (10 fache Vergrößerung)
(grau: Polymer; lila: Fibronectin)

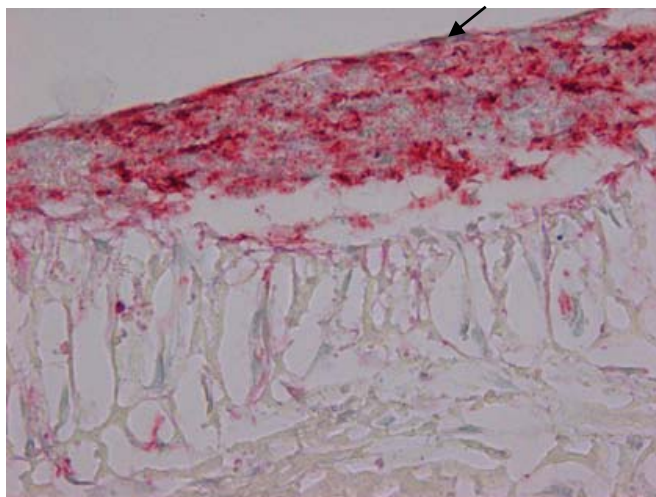


Abb.35

Positiver α -Aktin Nachweis der dynamisch geführten Klappen in der immunhistochemischen Färbung
(grau: Polymer; rosa: α -Aktin) (20 fache Vergrößerung)

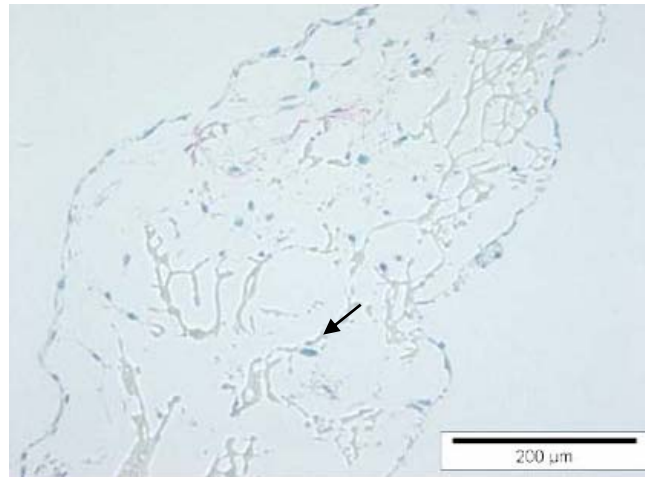


Abb.36

Nur schwach positiver Nachweis von Kollagen I bei der immunhistochemischen Untersuchung der statischen Klappen (grau:Polymer; blau:Kollagen I Nachweis)



Abb.37

Schwach positiver Nachweis von Fibronectin bei der immunhistochemischen Untersuchung der statisch belassenen Klappe. Beginnende Resorption des Polymers ist sichtbar (10 fache Vergrößerung)

Elektronenmikroskopie

Untersucht wurden die besiedelten und 7 Tage im Bioreaktor konditionierten Klappen, sowie die statischen als Kontrolle dienender Konstrukte.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte man die innere Struktur des Polymers erkennen, in deren Zwischenräume die Zellen einwuchsen, die Zellen selber und die von ihnen gebildete extrazelluläre Matrix.

Bei den konditionierten Konstrukten waren mehrschichtige auf der Oberfläche des Polymers adhärenente vitale Zellen erkennbar. Die Zellen waren gleichmäßig verteilt. Ein Einwachsen ins Innere des Polymers mit Bildung von Extrazellulärer Matrix war sichtbar.

Bei den statischen Kontrollen waren nur vereinzelt Zellen auf der Oberfläche des Polymers erkennbar, die zum Teil nicht mehr vital waren und nur ein spärliches Einwachsen ins Polymer zeigten (Abb.38). Es sind auf der statisch belassenen Klappe signifikant weniger Zellen sichtbar als auf der dynamisch konditionierten Klappe.

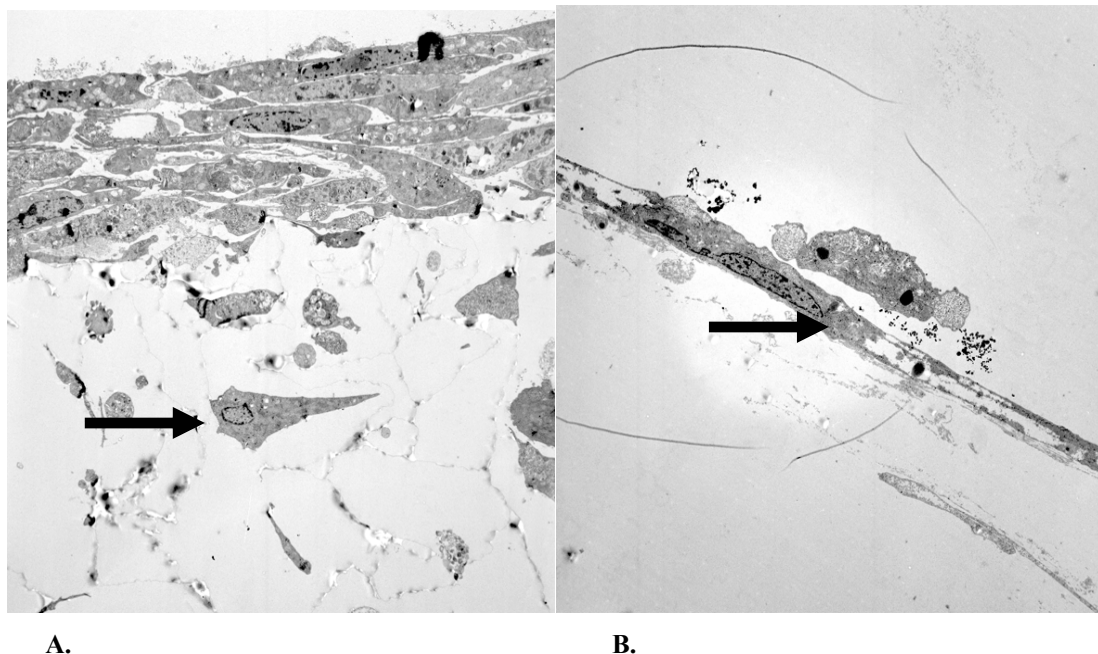


Abb.38
A. Elektronenmikroskopische Aufnahme der dynamisch geführten Klappe mit mehrschichtigen Zellverbänden
 Ein Einwachsen der Zellen ins Polymerinnere ist erkennbar (Pfeil zeigt auf Zellen)
B. Elektronenmikroskopische Aufnahme der statisch geführten Klappe mit nur einschichtiger Zelllage auf der
 Oberfläche des Polymers (Pfeil zeigt auf Zellen)

Untersuchungen auf Kollagen-Gehalt

Der quantitative Gehalt an Kollagen war bei den dynamisch im Bioreaktor konditionierten Herzklappenkonstrukten höher im Vergleich zu den statisch geführten Kontrollen, allerdings zeigte sich keine Signifikanz ($p=0,751$).

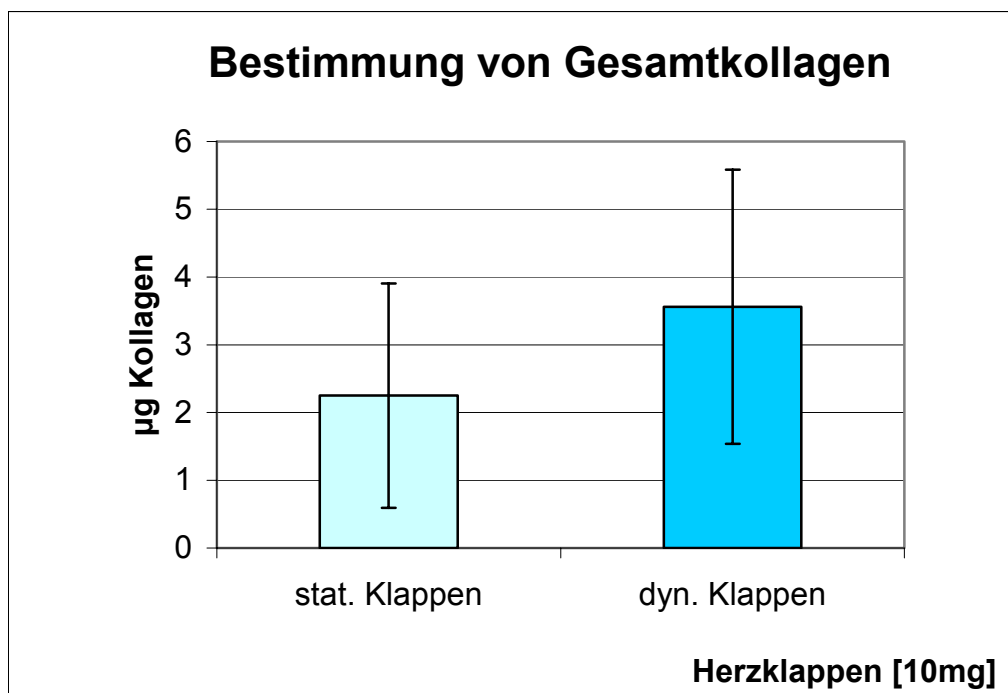


Abb.39
Kollagengehalt der statischen und dynamischen Klappe im Vergleich

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen von kryokonservierten Zellen und dem besiedelten Herzklappenkonstrukten

Hier zeigte sich bei allen Zellen und auch bei den auf dem Polymer besiedelten Zellen eine starke Kalzium $[Ca^{2+}]_i$ Antwort auch auf Histaminstimulation.

In den kultivierten Endothelzellen und Myofibroblasten aus der frischen und eingefrorenen Nabelschnur wurde kein Unterschied in der Ca-Antwort auf die Histamin-Stimulation festgestellt. (Abb.40)

Trotz der Eigenfluoreszenz der Polymerfasern erkennt man deutlich die Anlagerung der Zellen (Abb.41). Unter Histaminstimulation zeigten die auf dem Polymer besiedelte Zellen eine vergleichbare $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort wie die in Kultur belassenen Zellen.

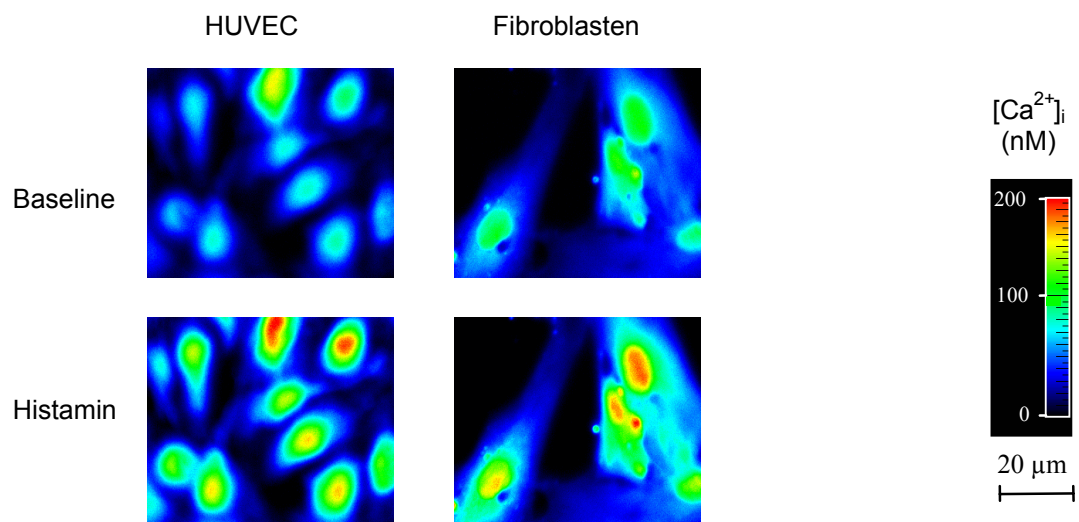
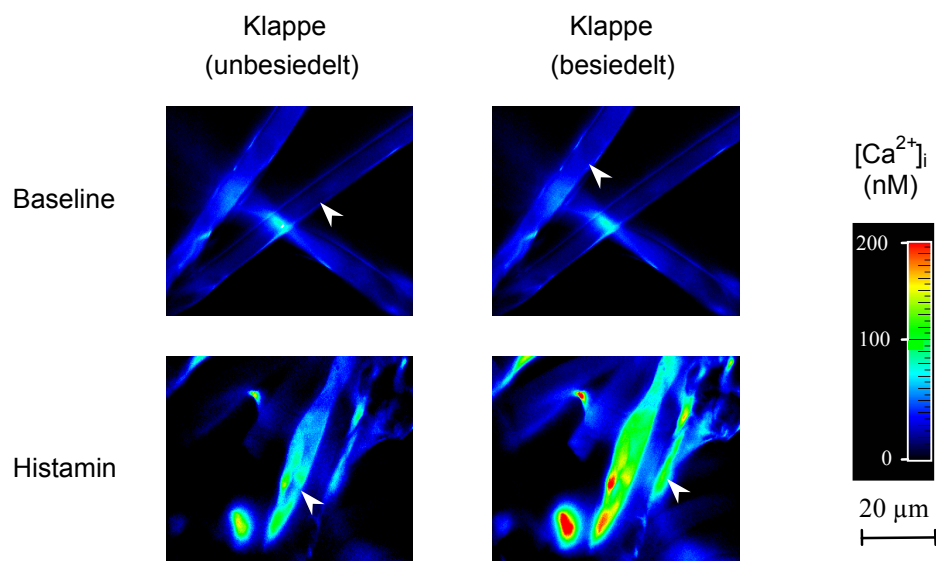


Abb.40

Ca-Antwort auf 10 μM Histamin in kultivierten Endothelzellen und Myofibroblasten aus der frischen und eingefrorenen Nabelschnur. Bei beiden wurde kein Unterschied in ihrer Antwort auf Histaminstimulierung festgestellt

**Abb.41**

Ca-Antwort auf 10 μM Histamin in unbesiedelten und mit Fibroblasten besiedelten Klappenpolymeren. In den nicht besiedelten Klappen sind die Einzelfasern des Polymergerüsts sichtbar (weiße Pfeile). In den besiedelten Klappen lagerten sich die Zellen an den Fasern des Gerüsts an (weißer Pfeil). Auf Stimulation mit Histamin zeigten sie eine vergleichbare $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort wie die kultivierten Zellen.

4. Diskussion

Im Ersatz von menschlichen Herzklappen sind zurzeit drei verschiedene Herzklappentypen klinisch im Einsatz: das glutaraldehydfixierte Xenograft, die mechanische Klappenprothese und Homografts. Alle drei weisen eine gute hämodynamische Funktion auf. Doch gibt es bei jeder einzelnen dieser Prothesen spezifische Limitationen, die alle mit Komplikationen und Einschränkungen für die einzelnen Patienten verbunden sind.^{64 65}

Den eingesetzten Prothesen ist gemeinsam, dass sie Fremdmaterial für den Körper des Patienten darstellen. Sie wachsen weder mit noch können sie regenerieren. Die Herzklappenprothesen haben demnach eine eingeschränkte Haltbarkeit und stellen ein erhöhtes Infektionsrisiko dar. Gegebenenfalls müssen sie durch einen weiteren operativen Eingriff entfernt bzw. ersetzt werden. Besonders schwerwiegend ist die Problematik des Nichtmitwachsens bei pädiatrischen Patienten. Diese „entwachsen“ ihrer Klappe und müssen sich deswegen Re-Operationen unterziehen.

Um einen Herzklappenersatz zu entwickeln, welcher diese Nachteile womöglich nicht aufweist, wurden in dieser Arbeit, die Prinzipien des Tissue Engineerings zur Herstellung einer vitalen und autologen Klappe angewandt.

Das Prinzip des „Tissue Engineering“ besteht darin, dreidimensionale Polymergerüste mit autologen Zellen zu besiedeln und in einem Bioreaktor zu konditionieren, um einen individuellen und funktionellen Gewebeersatz herzustellen.⁶⁶ Dieser so geschaffene vitale autologe Gewebeersatz wäre in der Lage, mitzuwachsen und sich gut der biologischen Umgebung anzupassen. Dieses „tissue engineerte“ Konstrukt könnte somit in den Körper, aus dem die Zellen ursprünglich entnommen wurden, reimplantiert werden.

Durch die Verwendung körpereigener Zellen für die Herstellung einer tissue engineerten Herzklappe könnten die genannten Probleme einer Fremdkörperreaktion umgangen werden. Diese Herzklappe hätte unter Umständen das Potential mitzuwachsen und könnte sich wie biologisches Material in das umgebende Gewebe integrieren.⁶⁷

Für die Herstellung eines „tissue engineerten“ Konstruktes ist die Wahl der Zellquelle sehr wichtig. Insbesondere bei kongenitalen Herzfehlern, die man pränatal im Ultraschall erkennt, sollte eine Zellquelle gewählt werden, die in einer kurzen Zeit genügend Zellmaterial zur Verfügung stellt und keinen weiteren operativen Eingriff benötigt.

Bis jetzt stehen für die Besiedlung von Polymergerüsten für das kardiovaskuläre Tissue Engineering verschiedene vaskuläre Zellquellen zur Verfügung.⁶⁸ So werden sowohl arterielle als auch venöse Myofibroblasten als Zellquelle eingesetzt. Der Vorteil der venösen Zellen aus z.B. Fragmenten der Vena saphena magna besteht in der einfachen Gewinnung durch nur kleine chirurgische Eingriffe. Seit kurzem werden auch mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Knochenmark benutzt. Sie besitzen noch die Fähigkeit, sich in verschiedene Ziellinien mesenchymalen Charakters zu differenzieren.

Die Nabelschnur stellt eine weitere attraktive Zellquelle für autogene Zellen dar. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Zellquellen ist die Nabelschnur nach der Geburt überflüssig und wird verworfen. Zudem stellt sie eine unkomplizierte Methode der Zellgewinnung dar, bei der in kürzester Zeit, ohne weitere operative Eingriffe, eine genügend hohe Zellzahl gewonnen werden kann. Es entfallen somit Entnahmeoperationen und das damit verbundene erhöhte perioperative Risiko.

Die Limitation dieser „frischen Nabelschnüre“ besteht darin, dass die Verwendung dieser Zellen auf die ersten Wochen nach der Geburt begrenzt ist, weil es bis jetzt keine geeignete Möglichkeit ihrer Haltbarmachung gab. Falls in diesem Zeitraum die vaskulären Zellen nicht aus der Nabelschnur isoliert wurden, weil kein Bedarf an „tissue engineerten“ Konstrukten vorlag, war diese Zellquelle für spätere Nutzungen nicht mehr zugänglich.

Durch die Möglichkeit der Kryokonservierung wäre ihre Verwendung nicht nur auf Neugeborene, deren Herzfehler in der Schwangerschaft diagnostiziert wurden, beschränkt. Auch bei Jugendlichen und älteren Patienten wäre eine Verwendung zu jedem ausgewählten Zeitpunkt potentiell möglich. Wie sich die Zellen nach längerfristigen Kryokonservierung verhalten und potentiell für eine womöglich lebenslange Zellbank in Frage kommen, wird aktuell im Labor für Tissue Engineering am Deutschen Herzzentrum evaluiert. Dieses Vorgehen setzt natürlich eine Etablierung einer individuellen Zellbank voraus.

In dieser Arbeit konnte die Möglichkeit der Kryokonservierung von vaskulären Zellen aus Nabelschnurgefäßen für das Tissue Engineering kardiovaskulärer Strukturen am Beispiel der Herzklappe demonstriert werden.

In den ersten Versuchsansätzen zeigte sich, dass nach dem Auftauprozess der im Einfriermedium eingefrorenen gesamten Nabelschnur kein Wachstum der Fibroblasten und der glatten Muskelzellen nachzuweisen war. Im Gegensatz dazu konnten die oberflächlichen Endothelzellen isoliert und weiter kultiviert werden. Sie wuchsen jedoch wesentlich langsamer als die aus der frischen Nabelschnur gewonnenen Zellen.

Der Einfrierprozess scheint durch pH-Wert Veränderung, Kristallbildung und Dehydratation zur Zerstörung der Gewebe zu führen.⁶⁹ Es ist bekannt, dass DMSO (Dimethylsulfoxide, ein gebräuchlicher Gefrierschutzzusatz) diesen Zerstörungseffekt minimiert.⁷⁰ Allerdings scheint DMSO nur die oberflächlichen Schichten der Nabelschnurgefäße zu schützen und dringt scheinbar nicht bis in die tieferen Schichten des Gewebes vor. So würde sich unserer Meinung nach die Tatsache erklären, dass das Wachstum der Myofibroblasten bei der Kryokonservierung der gesamten Nabelschnur nicht möglich war.

Deshalb wurde ein anderer Ansatz verfolgt. Die Zellen wurden jetzt zuerst aus den Nabelschnurgefäßen isoliert, kultiviert und erst dann mit DMSO Zusatz kryokonserviert.

Bei dieser Methode scheint DMSO fast jede Zelle einzeln zu ummanteln und diese beim Konservierungsvorgang vor dem „osmotischen Schock“ zu schützen, so wie es bei zahlreichen anderen Zellarten bereits beschrieben wurde.⁷¹

Die so kryokonservierten Endothelzellen und Myofibroblasten unterschieden sich weder in ihrer Morphologie, in der Histologie noch in ihrem Wachstumsverhalten von denen aus der frischen Nabelschnur präparierten Zellen.

Mit dieser neuen Zellquelle und ihrer Kryokonservierung ist eine Grundlage für die Herstellung sogenannter Zell-Polymer-Konstrukte gleich nach der Geburt oder durch Kryokonservierung zu einem späteren Zeitraum geschaffen worden. Es besteht so die Möglichkeit, autologe Zellen zu gewinnen, ohne einen zusätzlichen operativen Eingriff vornehmen zu müssen, wie es z.B. bei der arteriellen Zellgewinnung der Fall ist.

Für welchen Zeitraum die Zellen kryokonserviert werden können ohne an Funktion einzubüßen, ist bis jetzt noch nicht untersucht worden.

In dieser Arbeit wurden die Zellen exemplarisch für 3-6 Monate kryokonserviert. Wie die Zellen sich bei einer Konservierungszeit von mehreren Jahren verhalten, ist noch zu prüfen und wird aktuell in unserem Labor untersucht.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die kryokonservierten humanen vaskulären Zellen der Nabelschnur rekultiviert und expandiert werden können, um anschließend auf das entsprechende Polymergerüst besiedelt zu werden.

Da eine größere Anzahl von Zellen aus der Nabelschnur isoliert und kultiviert werden kann, als für ein „tissue engineertes“ Konstrukt benötigt wird, besteht zudem die Möglichkeit, mehrere Konstrukte zu unterschiedlichen Zeitpunkten herzustellen.

So hätte ein Patient jeder Zeit die Möglichkeit, auf einen Pool seiner eigenen Zellen zurückzugreifen, um unterschiedliche tissue engineerte Konstrukte für sich herstellen zu lassen.

In dieser Arbeit wurde als Gerüstmaterial das P4HB (Poly-4-hydroxybutyrate) verwendet. Es besitzt Eigenschaften, die von besonderer Bedeutung für das Tissue Engineering von Herzklappen sind. Dieses synthetische Polymer ist resorbierbar und biokompatibel. So kann sich parallel zum Resorptionsprozess genügend kardiovaskuläres Gewebe bilden. Es dient dazu der Herzklappe die entsprechende Form sowie ausreichende mechanische Eigenschaften zu verleihen. Es ist zudem thermoplastisch und damit gut formbar.

Um aus diesem Polymer die Form einer Herzklappe zu erhalten, wurde auf ein naturgetreues Stereolithographie-Modell zurückgegriffen. Dieses Modell wurde mittels der „rapid prototyping“ Technik hergestellt.⁷² Statt eines zylindrischen Konduits konnte ein Herzklappengerüst hergestellt werden, das der anatomischen Struktur von humanen Herzklappen exakt nachempfunden wurde.⁷³ Verwendet wurde dabei eine sogenannte Abdrucktechnik.

Das Herzklappengerüst wurde aus lediglich einem Polymer hergestellt. Dies hatte den Vorteil, dass kein weiteres Nahtmaterial oder andere Polymere verwenden werden mussten.

Durch das physiologische Design der Klappe und die Abwesenheit weiterer Nahtmaterialien erhöht sich unserer Meinung nach die hämodynamische Funktion dieser Klappe. Das Risiko von Thromboseentstehung würde sich damit verringern.⁷⁴ So war es möglich, selbst die „Sinus of Valsalva“ herzustellen, um ein dynamisch noch günstigeres und anatomisch genaueres Klappenmodell zu schaffen.

In den Vorversuchen zeigte sich, dass aufgrund der hydrophoben Eigenschaften dieses Polymers die Zellen nur schlecht auf der Polymeroberfläche anhafteten.

Auch wenn das Innere des Polymers porös ist, ist durch das Herstellungsverfahren die Polymeroberfläche glatt (Abb.42), so dass das Einwachsen in das Polymer erschwert ist.

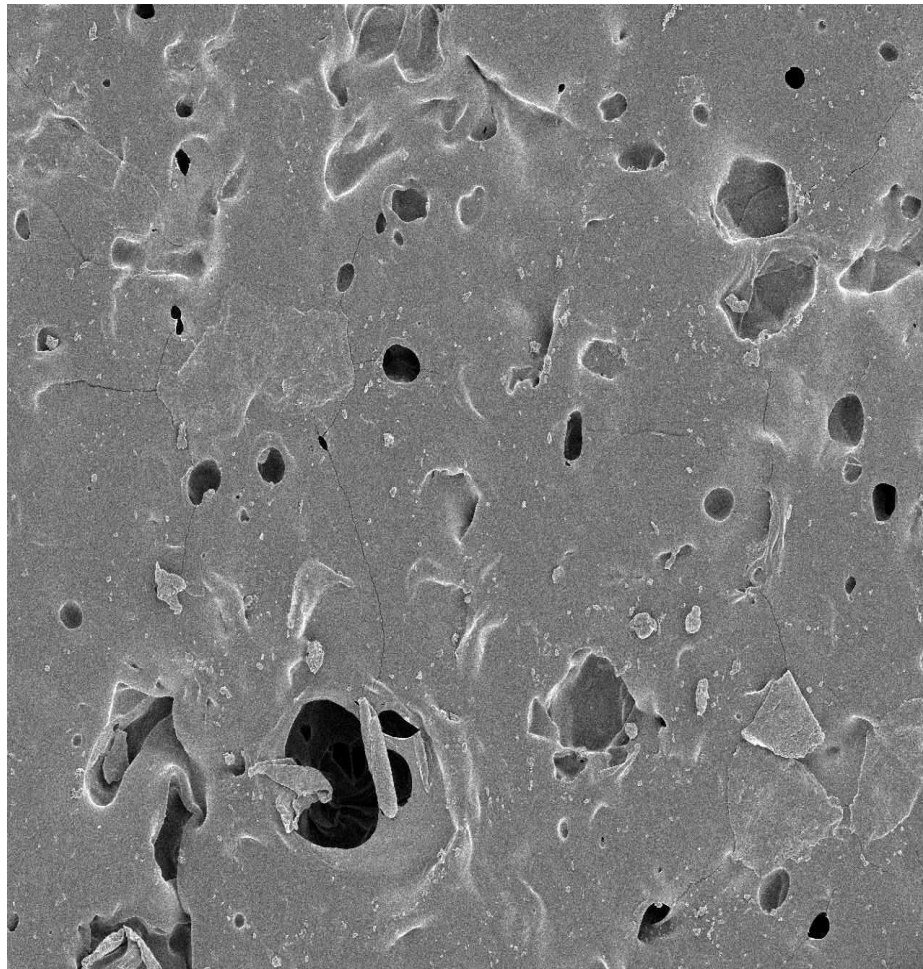


Abb.42

Die weitgehend glatte Oberfläche des verwendeten Polymers P4HB

Bei höheren mechanischen Belastungen wie z.B. unter den Flüssen im Bioreaktor lösten sich diese Zellen von der Oberfläche ab. Man spricht von einem sogenannten „peel-off-effect“.

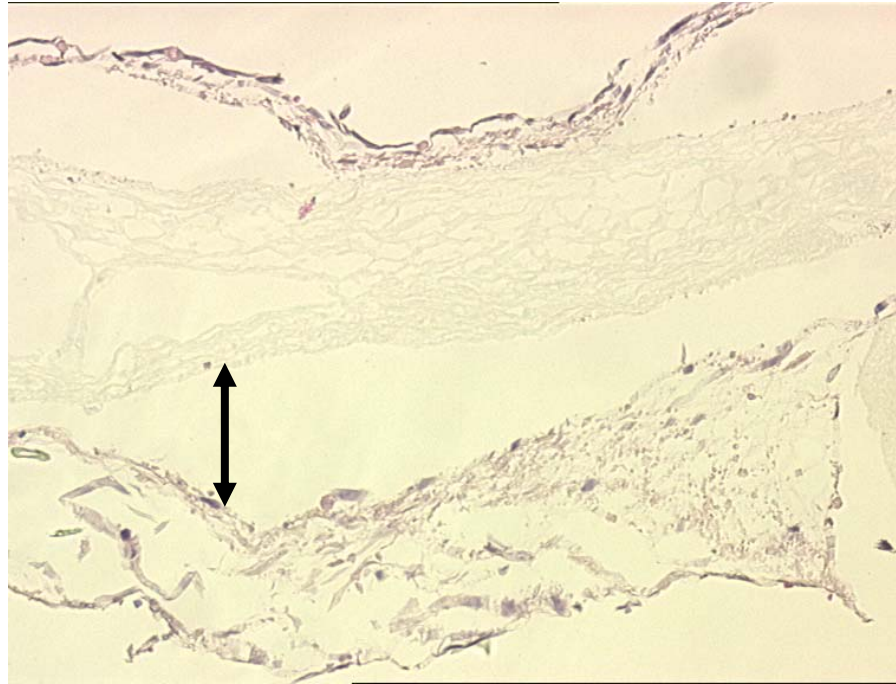


Abb.43

Die Zellen sind auf der Oberfläche des Polymers sichtbar, allerdings mit nur losem Kontakt.
 Die Zellschichten lösen sich von der Oberfläche ab
 (Doppelpfeil zeigt die Ablösung der Zellen vom Polymer „peel-off“ Phänomen)
 Ein Einwachsen in das Polymerinnere wird kaum beobachtet

Zur Umgehung dieser Problematik musste die Polymeroberfläche zum einen mechanisch angeraut werden, um das Einwachsen der Zellen zu gewährleisten. Zum anderen musste das Polymer beschichtet werden, um eine gute Adhärenz der Zellen bewirken zu können.

In den Vorversuchen ergab die Beschichtung mit fetalem Kälberserum die beste Zelladhärenz. Damit das fetale Kälberserum tatsächlich die Fasern des Polymers beschichtet und nicht durch das zugegebene Medium wieder abgespült werden konnte, musste diese Klappenkonstruktion für 24-48 Stunden in einem Exikator unter sterilen Bedingungen bei Unterdruck getrocknet werden. Erst dann konnte diese Klappe mit Zellen besiedelt werden.

Die bessere Zelladhärenz auf dem Polymer wurde einerseits durch eine längere Einwirkzeit der Zellen auf dem Polymer bis zur Mediumzugabe bewirkt. Andererseits war bei der Besiedlung auf eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Polymer zu achten.

Eine Inkubationszeit von 7 Tagen vor dem Einbau der Klappe in den Bioreaktor zeigte auch einen günstigen Effekt auf die Entstehung extrazellulärer Matrix und der Zelladhärenz.

Die Ergebnisse zeigen, dass aufgetaute vaskuläre Zellen aus Nabelschnurarterien am porösen Gerüstmaterial adhären, proliferieren und ein vitales mehrschichtiges Gewebe produziert wurde. Die extrazelluläre Matrixbildung ließ sich, wie auch von anderen Forschungsgruppen beschrieben,⁷⁵ durch eine pulsatile Konditionierung deutlich steigern.

Bei den dynamisch im Bioreaktor konditionierten Klappen waren aus histologischer Sicht alle Oberflächen komplett mit Zellen in organisiertem Zustand bedeckt. Zusätzlich wuchsen die Zellen von der Oberfläche in die Poren des Gerüstmaterials hinein. Sie formten hier komplexe Zell-Polymerkonstrukte.

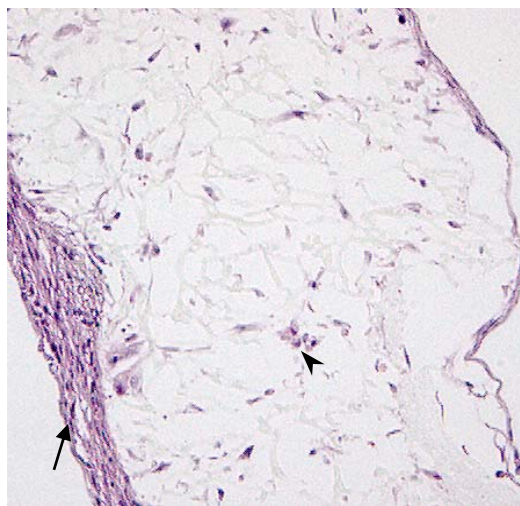


Abb.44

Hämotoxilin-Eosin Färbung der im Bioreaktor konditionierten Klappe. Der Pfeil deutet auf die mehrschichtigen Zelllagen hin. Ein Einwachsen der Zellen ins Polymerinnere ist zu erkennen (Pfeilspitze)

Die parallel im Inkubator geführten Kontrollen hingegen zeigten nur eine geringere Menge an Zellen im Inneren der Polymere und wirkten weniger organisiert als die im Bioreaktor konditionierten Klappen. Zudem konnte das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen nachgewiesen werden, und zwar bei den dynamisch in stärkerem Maße als bei den statisch durchgeführten Kontrollen.

Die immunhistologischen Untersuchungen der tissue engineerten Konstrukte ergaben weiterhin positive Resultate beim Nachweis von smooth-muscle-cell Aktin, Desmin, Kollagen und Fibronektin. So scheint die in vitro Konditionierung von den besiedelten Klappenpolymeren ausschlaggebend für die entsprechende Gewebeentstehung zu sein.

Auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten diese Annahme bestätigen. Hier wurde wiederum das stärkere Zellwachstum nicht nur an der Polymeroberfläche, sondern auch im Inneren unter dynamischer Konditionierung im Gegensatz zur statisch geführten Kontrolle deutlich.

Durch das „Imaging“ der intrazellulären Ca-Konzentrationen und zusätzlicher Histaminstimulation konnte die funktionelle Integrität von Fibroblasten nach Besiedlung der Herzklappen mittels fluoreszenzmikroskopischer real-time Bildgebung gezeigt werden.

Die fluoreszenztechnische Messung der intrazellulären Ca-Konzentration mittels der Flura-2 Ratio-Imaging Technik wurde bereits zur Messung von endothelialen Reaktionsmechanismen erfolgreich eingesetzt, sowohl in vitro als auch in vivo.^{64 76}

Mit diesem Verfahren konnte gezeigt werden, dass die Myofibroblasten und Endothelzellen aus den Nabelschnurgefäßen sowohl in Kultur, nach Kryokonservierung als auch nach erfolgreicher Klappenbesiedlung hinsichtlich ihrer zellulären Homöostase und ihrer Fähigkeit zu zellphysiologischen Reaktionen keinen Unterschied zeigten. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration unter Ausgangsbedingungen als auch nach Stimulation mit Histamin, einem typischen Kalzium-Mobilisator, wurde gemessen. Dabei war kein Unterschied in der Kalzium-Antwort hinsichtlich des Zeitverlaufs, der Amplitude oder Reversibilität zu erkennen.

So lässt sich daraus schließen, dass die Zellen durch den Kryokonservierungsvorgang nicht an Funktion eingebüsst haben und auch nach Besiedlung auf dem Polymer immer noch vital sind.

Durch Kryokonservierung haltbar gemachte Nabelschnurzellen kommen somit als potentielle Zellquelle für das Tissue Engineering von kardiovaskulären Geweben in Frage. Ab welchem Zeitraum der Kryokonservierung die Zellen an Funktionalität verlieren, sei noch zu prüfen. Eine Einrichtung einer autologen, humanen Zellbank sollte ebenso in Erwägung gezogen werden.

Es scheint grundsätzlich möglich zu sein, mit vitalen autologen kryokonservierten Nabelschnurzellen tissue engineerte Herzklappen herzustellen.

Zudem besaßen diese Klappen durch das Einwandern der Zellen in das poröse Polymer genügend eigene Matrix, um der mechanischen Beanspruchung durch Druck- und Scherkräften standhalten zu können.

Die dynamische Konditionierung der Klappen im Bioreaktor scheint ein wesentlich besseres Einwachsen der Zellen hervorzurufen⁷⁷ und sich positiv auf die Bildung der extrazellulären Matrix und der Zellproliferation auszuwirken. In weiterführenden Studien müssten neue Systeme mit unterschiedlichen Druckprofilen getestet werden, um eine optimale Matrixproduktion zu fördern.

Zurzeit werden die Besiedlung der Klappe und ihre Konditionierung in zwei verschiedenen, voneinander unabhängigen Systemen durchgeführt. Um die Gefahr einer Kontamination zu minimieren, wäre die Entwicklung von einem kombinierten Besiedlungs- und Konditionierungssystem ein möglicher neuer Arbeitsschritt.

Bevor sich ein klinischer Einsatz tissue engineerter Herzklappen realisieren lässt, wäre ein weiterer Schritt, nicht nur Myofibroblasten, sondern noch zusätzlich Endothelzellen für die Besiedlung zu benutzen. Damit würde nicht nur ein stabiler Gewebeverband entstehen, der durch die extrazelluläre Matrix-Produktion von den Myofibroblasten hergestellt worden wäre, sondern man hätte zusätzlich noch eine funktionsfähige Endothelzellschicht, die eventuell für eine noch bessere hämodynamische Funktion sorgen und eine Antikoagulation in vivo überflüssig machen würde.

Die Wahl eines geeigneten Polymergerüsts und seine Beschaffenheit sind von entscheidender Bedeutung für das Einwachsen der Zellen in das Polymer. Es muss nicht nur eine gewisse Porosität im Inneren aufweisen, sondern auch eine poröse Oberfläche besitzen, an der die Zellen imstande sind zu adhären und ins Polymer einzuwachsen. Es wäre also weiterhin nötig, Untersuchungen durchzuführen, die klären, mit welcher Beschichtung, welcher Porosität und mit welchem Klappendesign ein solches Herzklappengerüst idealerweise herzustellen ist, um letztendlich eine Anwendung am Menschen zu ermöglichen.

5. Zusammenfassung

Beim Tissue Engineering werden verschiedene Bereiche der Medizin, der Biologie und der Technik miteinander kombiniert. Das Ziel ist es, ein vitales und funktionales Ersatzgewebe herzustellen, das aus körpereigenen Zellen besteht. Dabei werden körpereigene Zellen auf ein resorbierbares Gerüst transplantiert und in vitro konditioniert, um ein vitales Ersatzgewebe zu schaffen, das stabil genug ist, um implantiert werden zu können. Dieses Konstrukt hätte die Fähigkeit, sich in das umgebende Gewebe zu integrieren und wie gesundes Gewebe zu entwickeln (z.B. mitwachsen). In dieser Arbeit konnten vaskuläre Zellen aus körpereigenen Nabelschnurgefäßen als neue Zellquelle evaluiert werden. Eine mögliche Verwendung dieser vaskulären Zellen der Nabelschnur wäre bei Neugeborenen, bei denen während der Schwangerschaft ein Herzklappenfehler diagnostiziert wurde. Ein großer Vorteil der Nabelschnur gegenüber den Fragmenten der Aorta ascendens und der Vena saphena magna ist, dass dieses Gewebe nach der Geburt überflüssig ist und verworfen wird. Damit wäre kein weiterer belastender Eingriff bei den Patienten erforderlich. Durch die Kryokonservierung dieser Zellquelle wäre somit auch eine Haltbarkeit möglich gemacht, die eine Verwendung dieser Zellquelle auch bei älteren Patienten zu jedem Zeitpunkt möglich macht.

Mit der Evaluierung der neuen vaskulären Zellquelle aus humanen Nabelschnurgefäßen und ihrer Kryokonservierung konnte aus diesen Zellen „tissue engineerte“ Herzklappen hergestellt werden. Diese mit kryokonservierten vaskulären Nabelschnurzellen hergestellten Herzklappen waren vital und zeigten unter dynamischen Konditionierungsbedingungen in einem dafür hergestellten Bioreaktor im Vergleich zu den statisch belassenen Klappen eine höhere extrazelluläre Matrix Produktion. Eine Verwendung der kryokonservierten vaskulären Zellen aus humanen Nabelschnurgefäßen ist somit für das Tissue Engineering von kardiovaskulären Strukturen wie das der Herzklappe möglich gemacht worden.

Literaturverzeichnis

- ¹ Gaziano, J. M.: Global Burden of Cardiovascular Disease, in Braunwald, Eugene (Hrsg), Douglas P. Zipes, Peter, Libby: Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine 6.Auflage, Philadelphia 2001, S.1-18

- ² Carabello BA, Crawford FA Jr. Valvular heart disease. N Engl J Med 1997;337:32-41

- ³ Alvaez J, Murday A 1995 Mitral valve repair . Br.J Hosp Med 53:221-225

- ⁴ Hufnagel CA, Harvey WP, Rabil P, McDermott TF (1952) Surgical correction of aortic insufficiency. Surgery 35: 673-683

- ⁵ Harken DE, Sorooff HS, Taylor WJ, Lefemine AA, Gupta SK, Lunzer S. Partial and complete prostheses in aortic insufficiency. J Thorac Cardiovasc Surg 1960;40:744

- ⁶ Starr A, Edward ML, McCord CW, Griswold HE. Aortic replacement: clinical experience with a semirigid ball-valve prothesis. Circulation 1963;27:779.

- ⁷ Korossis SA, Fisher J, Ingham E (2000) Cardiac valve replacement: a bioengineering approach. Biomed Mater Eng 10: 83-124

- ⁸ Braunwalde. 1997, Valvular heart disease. In: Heart disaese 5th edition, Braunwald E ed. Philadelphia: Saunders Company

- ⁹ Cannegieter SC, Rosendaal FR, Briet E. 1994, Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses. *Circulation*; **89**: 635-641

- ¹⁰ Vonpatanasin W, Hillis D, Lange RA: Prosthetic heart valves. N Engl J Med 1996; 335: 407.

- ¹¹ Miller DC. Predictors of outcome in patients with prosthetic valve endocarditis (PVE) and potential advantages of homograft aortic root replacement for prosthetic ascending aortic valve-graft infections. J Cardiac Surg 1990;5:53-62.

- ¹² Butany J, Fayet C, Ahluwali MS, Blit P, Ahn C, Munroe Cusimano RJ, Leask RL (2003) Biological replacement heart valves: identification and evaluation. *Cardiovasc Pathol* 12: 119-139
- ¹³ Bloomfield P, Wheatley DJ, Prescott RJ, Miller HC. Twelve year comparison of Björk-Shiley mechanical valve with porcine bioprotheses. *N Engl J Med* 1991; 324:573-9
- ¹⁴ Hammermeister KE, Sethi GK, Henderson WG et al. 1993, A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with mechanical valve or bioprosthesis. *N Engl J Med*; **328**: 1289-1296
- ¹⁵ Mitchell RN, Jonas RA, Schoen FJ (1995) Structure function correlations in cryopreserved allograft cardiac valves. *Ann Thorac Surg* :60: 108-113
- ¹⁶ Angell WW, Oury JH, Lamberti JJ, Kozio IJ (1989) Durability of the viable aortic allograft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 98:48-55
- ¹⁷ Rajani B, Mee RB, Ratcliff NB. 1998, Evidence for rejection of homograft cardiac valves in infants. *J Thorac Cardiovasc Surg*; **115**:111-17
- ¹⁸ Yankah AV, Wottge HU. 1997, Allograft conduit wall calcification in a model of chronic arterial graft rejection. *J Card Surg*. Mar-Apr; 12(2):86-92
- ¹⁹ Jamieson WR. 1993, Modern cardiac valve devices: bioprotheses and mechanical prostheses: state of the art. *J Card Surg*; **8**: 89-98
- ²⁰ Carabello BA, Crawford FA, Jr: Valvular Heart Disease. *New Engl J Med* 1997; 337: 32
- ²¹ Jamieson WR. 1993, Modern cardiac valve devices: bioprotheses and mechanical prostheses: state of the art. *J Card Surg*; **8**: 89-98
- ²² Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science*. 1993 May 14; 260(5110):920-6. Review

²³ Fuchs JR, Nasserie BA, Vacanti JP Tissue Engineering: A 21 st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001, 72: 577-591

²⁴ Wilson GJ, Courtman DW, Klement P, Lee MJ, Yeager H. 1995, Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery and heart valve replacement. *Ann Thorac Surg*; 60:S353-S358

²⁵ Bader A, Schilling T, Teebken OE, Brandes G, Herden T, Steinhoff G, Haverich A: Tissue engineering of heart valves – human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Europ Journal of Cardiothoracic Surgery*, 1998.

²⁶ Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A, Bader A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 2000 Nov 7;102(19 Suppl 3):III50-5.

²⁷ Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E, Wolner E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003 Jun; 23(6): 1002-6.

²⁸ Ye Q, Zünd G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, Hubbell JA, Turina M. 2000, Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*. May; 17(5):587-91

²⁹ Jockenhoevel S, Chalabi K, Sachweh J, Groesdonk HV, Demircan L, Messmer BJ (2001) Tissue engineering: complete autologous valve conduit- a new moulding technique. *Thorac Cardithorac Surg* 49: 287-290

³⁰ Puelacher WC, Mooney D, Langer R, Upton J, Vacanti JP, Vacanti CA. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials*. 1994 Aug;15(10):774-

³¹ Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science*. 1999 Apr 16;284(5413):489-93

- ³² Choi RS, Vacanti JP. Preliminary studies of tissue-engineered intestine using isolated epithelial organoid units on tubular synthetic biodegradable scaffolds. *Transplant Proc.* 1997 Feb-Mar;29(1-2):848-51
- ³³ Kaufmann PM, Sano K, Uyama S, Schloo B, Vacanti JP. Heterotopic hepatocyte transplantation using three-dimensional polymers: evaluation of the stimulatory effects by portacaval shunt or islet cell cotransplantation. *Transplant Proc.* 1994 Dec;26(6):3343-5.
- ³⁴ Shinoka T, Ma PX, Shum-tim D., et al: Tissue engineering heart valves. Autologous valves leaflet replacement study in a lamb model. *Circulation* 94 (Supp II): II164-II168, 1996
- ³⁵ Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. 1995, Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg.* Dec; **60**(6 Suppl):S513-6
- ³⁶ Shinoka T, Mayer JE Jr: New frontiers in Tissue Engineering: Tissue Engineered heart valves. In: *Synthetic biodegradable scaffold.* Birkhaeuser Boston (1997)
- ³⁷ Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, Shinoka T, Lien J, Moses MA, Stamp A, Taylor G, Moran AM, Landis W, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr. 1999, Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Ann Thorac Surg.* Dec; **68**(6):2298-304; discussion 2305
- ³⁸ Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ, Mayer Jr JE. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 2000;102(Suppl 3):III-44-III-49
- ³⁹ Sodian R, Sperling JS, Martin DP, Egozy A, Stock U, Mayer JE Jr, Vacanti JP. 2000, Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering. *Tissue Eng.* Apr; **6**(2):183-8.
- ⁴⁰ Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE: A new pulsative bioreactor for tissue engineering of heart valves. *Tissue Eng.* 2000; **6**(1): 75–9.

- ⁴¹ Sodian R, Sperling JS, Martin DP, Stock U, Mayer Jr JE, Vacanti JP. Trileaflet heart valve scaffold for tissue engineering from a combined polymer. *Tissue Eng* 1999;5(5).
- ⁴² Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Lueth T, Hetzer R. 2002, Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves. *ASAIO J.* Jan-Feb; 48(1): 12-6.
- ⁴³ Fu P, Sodian R, Szymanski D, Hein A, Kraemer L, Hoerstrup SP, Lueth T, Hetzer R. Tissue Engineering of heart valves: scaffold fabrication using rapid prototyping technique. In review
- ⁴⁴ Vacanti JP, Langer R. 1999, Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet.* Jul; **354** Suppl 1:SI32-4.
- ⁴⁵ Breuer CK, Shinoka T, Tanel RE, et al. 1996, Tissue engineering lamb heart valve leaflets. *Biotechnol Bioeng*; **35**: 1961-65
- ⁴⁶ Schnell AM, Hoerstrup SP, Zünd G, Kolb S, Sodian R, Visjäger JF, Grunenfelder J, Suter A, Turina M 2001, Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. Aortic human myofibroblasts. *Thorac Cardio Surg*; 49:221-225.
- ⁴⁷ Kadner A, Hoerstrup SP, Zund G, Eid K, Maurus C, Melnitchouk S, Grunenfelder J, Turina MI (2002) A new source for cardiovascular tissue engineering: human bone marrow stromal cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 21: 1055-160
- ⁴⁸ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*; **284**:143-147
- ⁴⁹ Perry TE, Kaushal S, Sutherland FW, Guleserian KJ, Bischoff J, Sacks M, Mayer JE. Thoracic Surgery Directors Association Award. Bone marrow as a cell source for tissue engineering heart valves. *Ann Thorac Surg.* 2003 Mar; 75(3): 761-7; discussion 767.

- ⁵⁰ Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, Sodian R, Visjager JF, Kold SA, Grunenfelder J, Zund G, Turina M (2002) Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation* 106 (suppl I): I-143-I150
- ⁵¹ Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of Human Endothelial Cells derived from Umbilical Veins. *J. of Clinical Investigation* Vol 52, 1973 2745-2756
- ⁵² Chih-Chang Chu. Biodegradable Polymeric Biomaterials: An Overview. In *The biomedical engineering handbook*, p 611-612, J.D. Bronzino, CRC Press 1995
- ⁵³ Kanda K, Matsuda T, Oka T: Mechanical stress induced cellular orientation and phenotypic modulation of 3-D cultured smooth muscle cells. *ASAIO* 39 (1993) M686-90
- ⁵⁴ Hoerstrup SP, Sodian R. New Pulsatile Bioreactor for In Vitro Formation of Tissue Engineered Heart Valves. *Tissue Engineering* 2000; 6, 75-79
- ⁵⁵ Madson DY et al. *J Cancer Res Clin Oncol* 101: 13-22, 1981
- ⁵⁶ Cordell JL et al, *J Histochem Cytochem* 32: 219-229, 1984
- ⁵⁷ Albelda, S.M. et al., *J. Cell Bio.*, 114, 1059 (1991)
- ⁵⁸ Cunningham, LW & Frederikson, D.W. (Eds) 1982, *Structure and contractile Proteins*. Part A. *Extracellular Matrix Methods in Enzymology* 82, 1-558
- ⁵⁹ Van der Rest, M, G.R., *Collagen family of proteins*. *FASEJ.*, 1991.5:2814-23
- ⁶⁰ Mayne R & Burgeson, R.E. (1987) *Structure and Function of Collagen Types* ; Academic Press, NY
- ⁶¹ Björn Reino Olsen. *Matrix Molecules and their Ligands*. *Principles of Tissue Engineering*. Second Ed. Lanza P. Langer R. Vacanti J. , Academic Press, 2000 pp 63ff
- ⁶² Foo IT, Naylor IL, Timmons MJ, Trejdosiewicz LK. Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab Invest*. 1992 Dec;67(6):727-33.

- ⁶³ Bhattacharya S, Ying X, , Fu C, Patel R, Kuebler WM, Greenberg S, Bhattacharya J. 2000, $\alpha_v\beta_3$ Integrin Induces Tyrosine Phosphorylation–Dependent Ca^{2+} Influx in Pulmonary Endothelial Cells. *Circ Res*; 86:456-462.
- ⁶⁴ Kirklin JK, Smith D, Novick W, et al. Long term function of cryopresered aortic homografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993;106:154-66
- ⁶⁵ Jamieson WRE, Tosado J, Munro AI, et al. Carpentier- Edwards standard porcine bioprothesis. Primary tissue failure (structural valve deterioration) by age groups. *Ann Thorac Surg* 1988;46:155-62
- ⁶⁶ Vacanti CA, Vacanti JP the science of tissue engineering. *Orthop Clin. North Am.* 2000 Jul, 31 (3): 351-6.
- ⁶⁷ Mooney DJ, Vacanti JP. Tissue engineering using cells and synthetic polymers. *Transplant Rev* 1993;7:153-61
- ⁶⁸ Shinoka T, Shum-D, MP PX, Tanel RE, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr (1997) Tissue-engineered heart valve leaflet: does cell origin affect outcome? *Circulation* 96(suppII):II-102-II-107.
- ⁶⁹ Meryman HT. 1974, Freezing injury and its prevention in living cells. *Ann Rev Biophys Bioeng*;3:341-363
- ⁷⁰ Locksley E McGann, Waterson ML. 1987, Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone. *Cryobiology*;14:451-465
- ⁷¹ Mironescu S. 1997, Hyperosmotic injury in mammalian cells. Survival of CHO cells in unprotected and DMSO- treated cultures. *Cryobiology*; 14:451-465
- ⁷² Sodian R, Loebe M, Hein A, Martin DP, Hoerstrup SP, Potapo EV, Hausmann H, Lueth T, Hetzer R. 2002, Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineering heart valves. *ASAIO J.* Jan-Feb; 48(1): 6-12

⁷³ Sodian R, Sperling JS, Martin DP, Stock U, Mayer Jr JE, Vacanti JP. Trileaflet heart valve scaffold for tissue engineering from a combined polymer. *Tissue Engineering* 1999; 5(5)

⁷⁴ Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, Moran A, Lien J, Martin DP, Schoen FJ, Vacanti JP, Mayer JE Jr. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 Apr;119(4 Pt 1):732-40.

⁷⁵ Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R, Langer R. Functional arteries grown in vitro. *Science.* 1999 Apr 16;284(5413):489-93.

⁷⁶ Kuebler WM, Ying X, Bhattacharya J. 2002, Pressure-induced endothelial Ca(2+) oscillations in lung capillaries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* May; 282(5): L917-23.

⁷⁷ Ziegler T, Nerem RM., Tissue engineering a blood vessel: regulation of vascular biology by mechanical stresses. *J Cell Biochem* 1995;56:204-9



UNIVERSITÄTSKLINIKUM · MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

CHARITÉ · D-13353 BERLIN

CAMPUS VIRCHOW-KLINIKUM

Herrn Prof. Dr. Hetzer
Deutsches Herzzentrum Berlin
Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Augustenburger Platz 1

13353 Berlin

Ethik-Kommission

Vorsitzender: Prof. Dr. med. H. Eichstädt

Wiss. Mitarbeiter: Ass. jur. Ch. von Dewitz

Telefon: (0 30) 450-570024

Telefax: (0 30) 450-570988

E-Mail: christian.von_dewitz@charite.de

vD 16. November 2001

Betr.: „Isolierung und Kryokonservierung von vaskulären Zellen aus menschlichen Nabelschnurvenen für das „Tissue Engineering“ von kardiovaskulären Geweben“

Antragsnummer: 186/2001

Vorg.: Schreiben v. 31.10.2001, 08.11.2001

Sehr geehrter Herr Professor Hetzer,

hiermit bestätigen wir, dass Ihr o.g. Antrag in der 274. Sitzung der Ethik-Kommission am 15.11.2001 von den Mitgliedern beraten wurde.

Die Ethikkommission stimmt der o.g. Studie als ethisch vertretbar zu.

Nachfolgend aufgeführte Mitglieder der Ethik-Kommission haben an der Beratung der o.g. Studie teilgenommen:

Herr Prof. Dr. Eichstädt, Herr Prof. Dr. Helge, Herr Prof. Dr. Ziegler, Herr PD Dr. Laube, Frau Dr. Gellermann, Herr Schlütter, Herr Mellwig, Frau Platzek

Für weitere Rückfragen stehen wir gern zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. H. Eichstädt
Vorsitzender

Danksagung

Bei dieser Arbeit haben mich viele Menschen unterstützt, denen ich hiermit herzlichst danken möchte.

Insbesondere gebührt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Dr.med. Dr.hc.mult. Hetzer für die Überlassung des Themas, für seine Unterstützung und Hilfe sowie für die schöne Zeit in seinem Institut.

Ich danke meinem Betreuer Herrn Dr.med. Sodian, der in mir das Interesse am Gebiet des Tissue Engineering weckte und mir die Möglichkeit zur Erarbeitung dieses Projektes gab. Durch ihn habe ich eine Menge lernen können.

Ebenso gilt mein Dank Frau Dr. Lüders für ihre besondere Unterstützung.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Kübler, Herrn Professor Kuppe, Professor Meyer und seinem Team sowie Professor Shakibaei für die sehr gute Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt all meinen Freunden, die mich immer unterstützen, Stefan Röschert, der mir immer mit Rat zur Seite stand und insbesondere meinen geliebten Eltern, die immer an mich geglaubt haben.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Liv Krämer, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.